

# **Analyse der neuroprotektiven und angio- genen Eigenschaften von Norrin in der Netzhaut**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von

**Ludwig Franz Zeilbeck**

aus Kösching

im Jahr 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:  
31.01.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:  
PD Dr. Andreas Ohlmann

Unterschrift:

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Norrin .....	1
1.1.1	Das Norrie-Syndrom .....	1
1.1.2	Das <i>NDP</i> -Gen und das Norrin-Protein .....	1
1.1.3	Expressionsorte für Norrin .....	2
1.1.4	Norrin-Signalwege .....	3
1.1.4.1	Norrin als multifunktionaler Ligand .....	3
1.1.4.2	Der Norrin/Frizzled-4-Signalweg .....	4
1.1.4.2.1	Inhibitoren der GSK-3 $\beta$ .....	7
1.1.5	Funktionelle Eigenschaften von Norrin .....	7
1.2	Gefäßentwicklung in der Netzhaut .....	10
1.2.1	Aufbau der Netzhaut .....	10
1.2.2	Bildung der intraretinalen Gefäßplexus .....	11
1.2.3	Der proangiogene Faktor IGF-1 .....	13
1.2.4	Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) .....	14
1.3	Modelle für die Schädigung retinaler Ganglienzellen .....	16
1.3.1	Das NMDA-Schadensmodell .....	16
1.3.2	Das DBA/2J-Mausmodell .....	16
2	Zielsetzung .....	18
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Materialliste .....	20
3.1.1	Reagenzienliste .....	20
3.1.2	Enzyme und Reagenzien-Kits .....	23
3.1.3	Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter .....	23
3.1.4	Antikörper und Molekulargewichtsstandard .....	24
3.1.5	Rezepte für Gele, Lösungen und Puffer .....	25
3.1.6	Materialien und Geräte .....	29



3.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	30
3.2	<i>In vitro</i> Versuche .....	31
3.2.1	Allgemeine Arbeitstechniken.....	31
3.2.2	Isolation und Kultivierung von Müllerzellen .....	33
3.2.3	Kultivierung von primären mikrovaskulären Endothelzellen .....	33
3.2.4	Kultivierung von EBNA-pSNOS-Zellen .....	34
3.2.5	Ermittlung der Zellzahl .....	35
3.2.6	Behandlung von Zellen für RNA- und Proteinanalysen.....	35
3.2.7	Bestimmung der Zellproliferationsrate .....	36
3.2.8	Analyse der Zellviabilität .....	37
3.2.9	Untersuchung der Migration.....	38
3.2.10	Immunzytochemische Färbung.....	38
3.3	<i>In vivo</i> Versuche.....	40
3.3.1	Versuchstiere und Tierhaltung .....	40
3.3.2	Gewebepräparationen .....	41
3.3.2.1	Perfusion von Mäusen.....	41
3.3.2.2	Entnahme von Augen, Sehnerven und Schwanzbiopsien .....	42
3.3.2.3	Retinapräparation.....	44
3.3.2.4	Herstellung von retinalen Häutchenpräparaten .....	44
3.3.3	Intraperitoneale und intravitreale Injektionen .....	45
3.3.4	Das NMDA-Schadensmodell .....	46
3.3.5	Das DBA/2J-Mausmodell.....	46
3.3.5.1	Messung des intraokularen Drucks .....	47
3.3.5.2	Bewertungskriterien für den vorderen Augenabschnitt.....	47
3.3.5.3	Evaluation der Sehnervenschädigung.....	48
3.3.6	Quantifizierung der RGC-Axonzahl.....	48
3.3.7	Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie .....	50
3.3.7.1	Experimentelle Durchführung.....	50

3.3.7.2	Quantifizierung der retinalen Gefäßveränderungen .....	50
3.3.8	Dickenmessung von Retina, INL und ONL .....	51
3.4	Molekularbiologische Techniken .....	52
3.4.1	DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien.....	52
3.4.2	Genotypisierungs-PCR .....	52
3.4.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	53
3.4.4	RNA-Extraktion .....	53
3.4.5	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	54
3.4.6	Northern Blot.....	55
3.4.7	cDNA-Herstellung .....	57
3.4.8	Quantitative real-time RT-PCR .....	58
3.5	Proteinbiochemische Techniken.....	59
3.5.1	Proteinextraktion .....	59
3.5.1.1	Extraktion mit RIPA-Puffer.....	60
3.5.1.2	TriFast™ Methode .....	60
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay .....	61
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
3.5.4	Western Blot Transfer .....	63
3.5.5	Dot Blot Transfer .....	63
3.5.6	Färbemethoden für Proteine .....	64
3.5.6.1	Coomassie-Färbung.....	64
3.5.6.2	Silberfärbung .....	65
3.5.7	Nachweis spezifischer Proteine in Western und Dot Blot Analysen.....	65
3.5.8	Aufreinigung von rhNorrin .....	67
3.5.8.1	Heparin Chromatographie .....	68
3.5.8.2	Proteindialyse .....	69
3.5.8.3	Bestimmung der Norrin-Konzentration .....	69
3.5.8.4	Testung der Bioaktivität.....	69

3.6	Histologische Techniken .....	70
3.6.1	Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten.....	70
3.6.2	Histologische Färbemethoden .....	71
3.6.2.1	Färbung mit Paraphenyldiamin.....	71
3.6.2.2	Färbung nach Richardson .....	71
3.6.3	Kryoeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten.....	71
3.6.4	Immunhistochemische Färbung.....	72
3.7	Mikroskopie .....	73
3.8	Auswertung und Statistik.....	73
4	Ergebnisse .....	74
4.1	Charakterisierung der Pax6-Norrin Mäuse und deren Analyse in RGC-Schadensmodellen.....	74
4.1.1	Expression von transgenem Norrin in Pax6-Norrin Mäusen .....	74
4.1.2	Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Pax6-Norrin Mäusen.....	75
4.1.3	Untersuchung des Phänotyps von Pax6-Norrin Mäusen .....	76
4.1.4	Analyse von Pax6-Norrin Mäusen im NMDA-Schadensmodell.....	81
4.1.5	Pax6-Norrin Mäuse im genetischen DBA/2J Hintergrund .....	84
4.1.5.1	Analyse der Sehnerven vor Entwicklung eines Glaukoms.....	84
4.1.5.2	Intraokulare Druckveränderungen .....	86
4.1.5.3	Veränderungen im vorderen Augenabschnitt und der Retina.....	87
4.1.5.4	Schädigung der Sehnerven im experimentellen Glaukom.....	92
4.2	Untersuchung der angiogenen Wirkung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ...	95
4.2.1	Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen durch LiCl und SB216763.....	95
4.2.2	Vermittlung angiogener Eigenschaften auf mikrovaskuläre Endothelzellen durch LiCl und SB216763 <i>in vitro</i> .....	98
4.2.3	Wirkung von LiCl auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Generierung einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie	101
4.3	Untersuchung der Norrin-induzierten IGF-1-Expression .....	107

4.3.1	Norrin-vermittelte IGF-1-Expression <i>in vitro</i> .....	107
4.3.2	IGF-1-Expression während der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) unter dem Einfluss von Norrin .....	110
4.3.3	Analyse der Rolle einer gesteigerten IGF-1-Expression bei der Norrin-induzierten Rekapillarisation nach OIR .....	112
5	Diskussion.....	115
5.1	Der Einfluss von Norrin beim experimentellen Glaukom .....	115
5.2	Die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bei der Rekapillarisation nach einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie .....	124
5.3	Die Beteiligung der Norrin-vermittelten Induktion von IGF-1 an der retinalen Rekapillarisation nach OIR.....	128
6	Zusammenfassung.....	133
7	Anhang.....	135
7.1	Literaturverzeichnis .....	135
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	147
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	152
7.4	Tabellenverzeichnis.....	154
7.5	Danksagung .....	156
7.6	Erklärung .....	158

# 1 Einleitung

In den vergangenen Jahren konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das sekretierte Protein Norrin in der Netzhaut über angiogenes (Ohlmann *et al.* 2010) und neuroprotektives (Seitz *et al.* 2010) Potential verfügt. Die Funktionsweise von Norrin, im Hinblick auf beide genannten Eigenschaften genauer zu studieren, war Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

## 1.1 Norrin

### 1.1.1 Das Norrie-Syndrom

Das Norrie-Syndrom, das nach Dr. Gordon Norrie benannt ist, der es 1927 erstmals beschrieb, wird X-chromosomal-rezessiv vererbt, ist androtrop und gekennzeichnet durch eine frühe Gefäßproliferation (Pseudogliom) in der Retina, einer Atrophie des Augapfels (*Phthisis bulbi*) und bilateraler Erblindung ab oder kurz nach der Geburt (Donnai *et al.* 1988; Holmes 1971; Norrie 1927; Warburg 1961, 1966, 1971). Die Untersuchung von, durch das Norrie-Syndrom erblindeten Männern, zeigte zudem bei 25 % eine mentale Retardierung und bei 1/5 bis 1/4 eine sensorineurale Gehörlosigkeit (Warburg 1971). Auch konnten Störungen im Wachstum, eine Keimdrüsenunterfunktion und ein erhöhtes Infektionsrisiko mit dem Norrie-Syndrom in Verbindung gebracht werden (Gal *et al.* 1986). Das Syndrom wird ausgelöst von Mutationen im *NDP* („Norrie disease (pseudoglioma)“)-Gen (vgl. 1.1.2), die meist das Exon 3 betreffen (Berger *et al.* 1992; Meindl *et al.* 1992). Interessanterweise entwickeln auch Norrin-defiziente Mäuse (*Ndp*<sup>+/−</sup>) sensorineurale Gehörlosigkeit (Rehm *et al.* 2002), zeigen Missbildungen der retinalen Gefäße (Richter *et al.* 1998) und erblinden (Ruether *et al.* 1997).

### 1.1.2 Das *NDP*-Gen und das Norrin-Protein

Norrin ist ein kleines (beim Menschen: 133 Aminosäuren, bei der Maus: 131 Aminosäuren) sekretiertes Protein mit einem vermuteten N-terminalen Signalpeptid und verfügt über ein *in silico* vorhergesagtes C-terminales Cystein-Knoten-Motiv,

welches eine Sequenzhomologie zu im Säugerorganismus bekanntem BMP („Bone morphogenetic protein“)-Antagonisten aufweist (Battinelli *et al.* 1996; Deng *et al.* 2013; Meindl *et al.* 1992; Ohlmann & Tamm 2012). Norrin bildet Oligomere, die über Disulfidbrücken vernetzt sind und mit der extrazellulären Matrix in Kontakt stehen (Perez-Vilar & Hill 1997). Des Weiteren besitzt Norrin eine hohe Affinität zu Heparin (Smallwood *et al.* 2007). Die Wirkung von Norrin wird sehr wahrscheinlich para- oder autokrin vermittelt (Ohlmann & Tamm 2012; Xu *et al.* 2004). Kodiert wird Norrin im Menschen durch das *NDP* („Norrie disease (pseudoglioma)“)-Gen das auf dem X-Chromosom (Genlocus: Xp11.3-11.4) lokalisiert ist (Chen *et al.* 1992). Das *Ndp*-Gen der Maus liegt ebenfalls auf dem X-Chromosom (Battinelli *et al.* 1996). Sowohl beim Menschen auch als auch bei der Maus enthält das Gen 3 Exone, wobei es sich bei Exon 1 um ein nicht-kodierendes Exon handelt (Battinelli *et al.* 1996). Exon 3 kodiert für das funktional wichtige Cystein-Knoten-Motiv (Battinelli *et al.* 1996). Die Homologie zwischen dem menschlichen und dem murinen Norrin-Protein beträgt 95 % (bzw. 99 % in Bezug auf Exon 3) (Battinelli *et al.* 1996). Mutationen im *NDP*-Gen, die meist mit der Herabsetzung der Aktivität des Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs einhergehen, sind verantwortlich für das Norrie-Syndrom (vgl. 1.1.1) und sind außerdem assoziiert mit der familiären exudativen Vitreoretinopathie (FEVR), der *Retinopathia praematurorum*, dem hyperplastischen primären Glaskörper sowie dem Morbus Coats (Nikopoulos *et al.* 2010; Ohlmann & Tamm 2012).

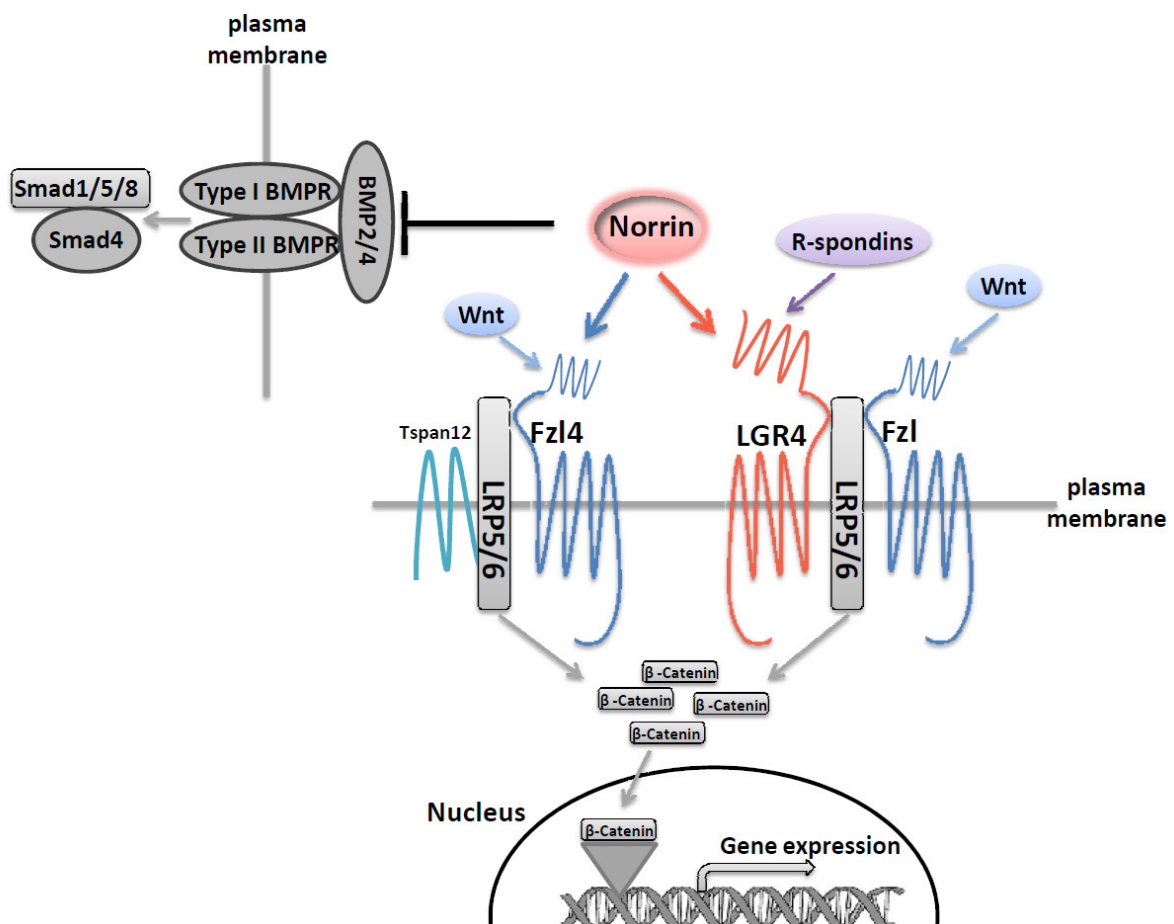
### 1.1.3 Expressionsorte für Norrin

Die mRNA für Norrin konnte mittels *in situ* Hybridisierungen in der inneren Körnerschicht sowie in der Ganglienzellschicht der Retina von Maus, Kaninchen und Mensch nachgewiesen werden (Berger *et al.* 1996; Hartzler *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Kockin-Mäuse mit einer Insertion der Sequenz für alkalischen Phosphatase (AP) in den *NDP*-Locus (*Ndp*<sup>AP/+</sup>) eine starke Expression von Norrin in den Müllerzellen, welche in weiblichen Tieren durch das Mosaik der X-Chromosom-Inaktivierung sichtbar gemacht werden konnte (Ye *et al.* 2009). Abweichend davon konnten Immunfärbungen, an Retinae während ihrer Entwicklung, Norrin entlang retinaler Gefäße lokalisieren (Lee *et al.* 2012). Mittels Northern Blot konnte gezeigt werden, dass Norrin in der Netzhaut von Mäusen lebenslang exprimiert ist (Lenzner *et al.* 2002). Durch *in situ*-Hybridisierung konnte Norrin-mRNA außerdem im Gehirne

detektiert werden (Berger *et al.* 1996; Hartzer *et al.* 1999). Wieder mit Hilfe der *Ndp<sup>AP/+</sup>*-Mäuse wurde die Expression von Norrin in den Astrozyten des Prosencephalon und des Mesencephalon sowie in den Bergmann-Glia des Cerebellums verortet (Ye *et al.* 2011). Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von Norrin in der Cochlea des Innenohrs auf die *Stria vascularis* und ein Gefäßnetz zwischen dem Corti-Organ sowie dem *Ganglion spirale* beschränkt ist (Ye *et al.* 2010). Norrin-mRNA wurde außerdem im Uterus, im Ovar und der Dezidua von Mäusen sowie in der menschlichen Plazenta nachgewiesen (Hsieh *et al.* 2005; Luhmann *et al.* 2005b).

## 1.1.4 Norrin-Signalwege

### 1.1.4.1 Norrin als multifunktionaler Ligand



**Abb. 1: Norrin als multifunktionaler Ligand.**

Schematische Darstellung der Norrin-Bindungspartner. Norrin kann sowohl an den Frizzled-4-Rezeptor (Fzl4) als auch an LGR4 binden, woraus jeweils eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs resultiert. Darüber hinaus ist Norrin in der Lage, durch Interaktion mit BMP2 bzw. 4, den TGF-β-Signalweg zu inhibieren. Nach Deng *et al.* (Deng *et al.* 2013).

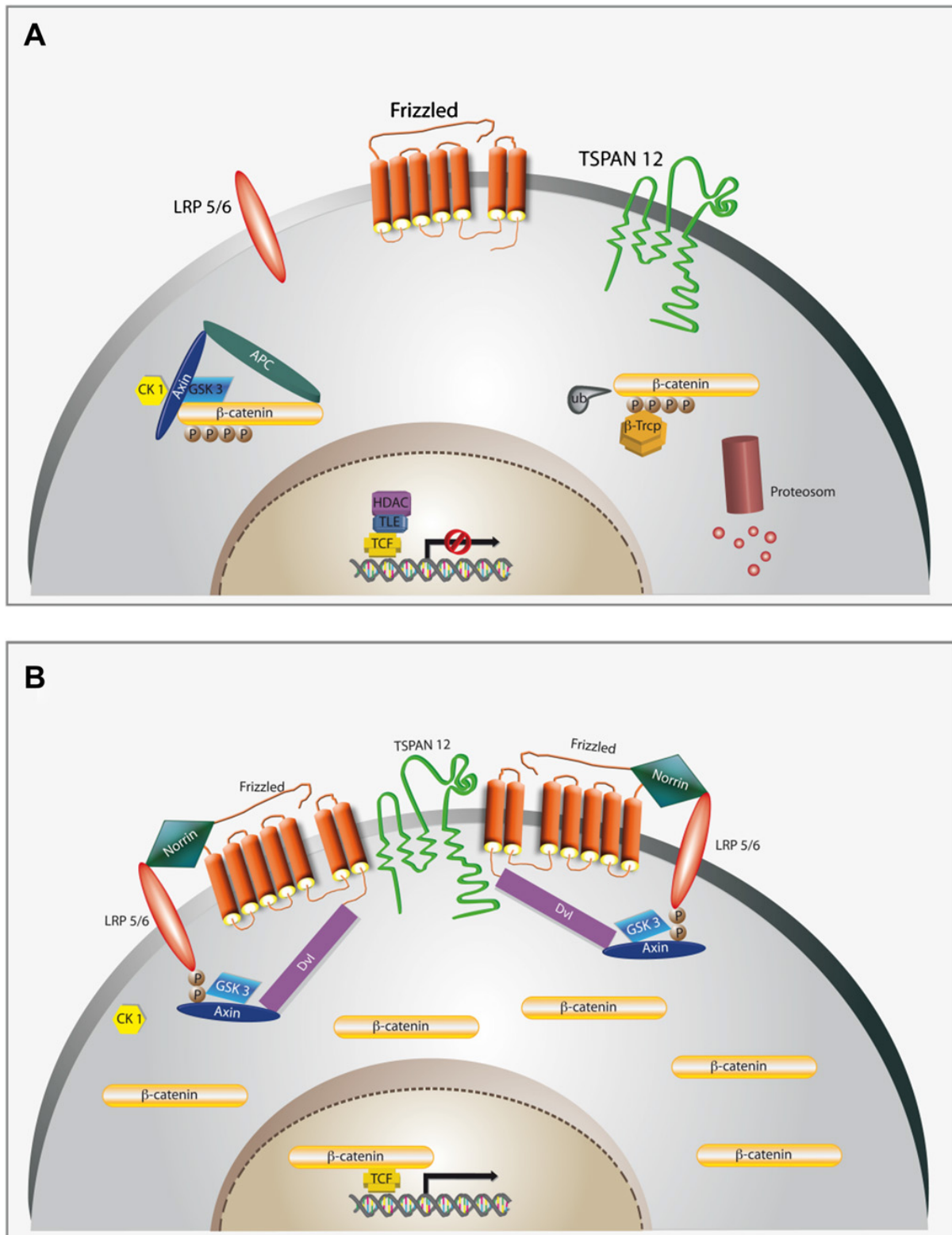
Norrin bindet, trotz fehlender Homologie zur Wnt-Familie („Wingless-type MMTV integration site family“), mit hoher Affinität an den Frizzled-4-Rezeptor und aktiviert den klassischen Wnt-Signalweg (vgl. 1.1.4.2; Xu *et al.* 2004). In einer aktuellen Arbeit konnte durch Bindungsstudien außerdem nachgewiesen werden, dass Norrin an LGR4 („Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4“) bindet und so ebenfalls den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert. Allerdings zeigen Versuche mit an Norrin gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP), dass AP-Norrin eine geringere Affinität zu LGR4 als zum Frizzled-4-Rezeptor besitzt (Deng *et al.* 2013). LGR4 ist bekannt als R-spondin-Rezeptor (Cruciat & Niehrs 2013). Bei Bindung von R-spondin arbeitet LGR4 mit Wnt3a zusammen an der Aktivierung des klassischen Wnt-Signalwegs (Cruciat & Niehrs 2013). Neben der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs konnte in *Xenopus* auch eine Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalwegs durch Norrin beobachtet werden (Xu *et al.* 2012). Bindungsstudien zeigen, dass in *Xenopus* Norrin mit BMP4 und Nodal1 (beides Liganden des TGF- $\beta$ -Signalwegs) interagiert und so den TGF- $\beta$ -Signalweg inhibiert (Xu *et al.* 2012). In ähnlicher Weise konnten Versuche mit Säugerzellen Norrin als Antagonisten von BMP2 und 4 ausweisen, welcher den SMAD1/5/8-vermittelten TGF- $\beta$ -Signalweg inhibieren kann (Deng *et al.* 2013). Die Aktivierung des klassischen Wnt-Signalwegs über den Frizzled-4-Rezeptor und LGR4 sowie die Inhibition des TGF-Signalwegs machen Norrin zu einem multifunktionalen Liganden (vgl. Abb. 1).

#### 1.1.4.2 Der Norrin/Frizzled-4-Signalweg

Bei der Untersuchung von *Ndp* (Norrin)-, *Fzd4* (Frizzled-4-Rezeptor)- und *Lrp5* („Low density lipoprotein receptor-related protein 5“- Knockout-Mäusen konnte ein jeweils ähnlicher Phänotyp, der unter anderem durch trunkierte intraretinale Gefäßplexus und durch persistierende Hyaloidgefäße gekennzeichnet ist, festgestellt werden (Luhmann *et al.* 2005a; Rehm *et al.* 2002; Xia *et al.* 2008; Xu *et al.* 2004; Ye *et al.* 2009; Ye *et al.* 2010). Dies gibt einen deutlichen Hinweis, dass Norrin zusammen mit *Fzd4* und *Lrp5*, in einem gemeinsamen Signalweg an der retinalen Gefäßentwicklung beteiligt ist. Eine von *Fzd4* und *Lrp5/6* abhängige Aktivierung des klassischen Wnt-Signalwegs durch Norrin konnte in Luciferase-Assays nachgewiesen werden (vgl. 1.1.4.1; Xu *et al.* 2004). Nachfolgend ergab eine Studie, dass Norrin spezifisch an die „Cysteine-rich domain“ (CRD) des Frizzled-4-Rezeptors und nicht an die CRD der



übrigen Frizzled-Rezeptoren und sFRPs („secreted frizzled-related proteins“) bindet (Smallwood *et al.* 2007). Über Wnt-Signalwege werden viele Entwicklungsprozesse während der Embryoentwicklung und ein Teil der späteren Gewebshomöostase reguliert (Logan & Nusse 2004). Man unterscheidet zwischen dem kanonischen (oder klassischen) Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und nicht-kanonischen ( $\beta$ -Catenin unabhängigen) Wnt-Signalwegen (Komiya & Habas 2008). Ist der klassische Wnt-Signalweg inaktiv, weil kein Ligand (Wnt oder Norrin) bindet, bildet  $\beta$ -Catenin einen Komplex mit Axin, APC („Adenomatous polyposis coli“), GSK-3 $\beta$  („Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ “) sowie CK1 („Casein kinase 1, alpha 1“) und wird durch beide Kinasen phosphoryliert (MacDonald *et al.* 2009). Anschließend wird das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin durch die E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -Trcp („Beta-transducin repeat containing“) ubiquitiniert und der proteosomalen Degradation zugeführt (vgl. Abb. 2 A; MacDonald *et al.* 2009). Bindet Norrin hingegen an den Rezeptorkomplex aus Frizzled-4-Rezeptor und Korezeptor LRP5/6, so wird der  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex inaktiviert, das konstitutiv gebildete  $\beta$ -Catenin reichert sich im Cytoplasma an und transloziert in den Zellkern (vgl. Abb. 2 B; Ohlmann & Tamm 2012). Dort interagiert  $\beta$ -Catenin mit Lef („Lymphoid enhancer-binding factor“)/TCF („T-cell factor“)-Transkriptionsfaktoren und induziert die Expression von Zielgenen (Ohlmann & Tamm 2012). Der so aktivierte Frizzled4/Norrin-Signalweg kann durch Dickkopf-1 (DKK-1), welches mit hoher Affinität an Lrp5/6 bindet, inhibiert werden (Cruciat & Niehrs 2013). In einer neueren Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass auch der Knockout von Tspan12 („Tetraspanin 12“, ein Transmembranprotein) in Mäusen zu einem Phänotyp führt, welcher mit dem von *Ndp*<sup>+/+</sup>, *Fzd4*<sup>-/-</sup> und *Lrp5*<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbar ist (Junge *et al.* 2009). Im TOP-flash Assay, bei denen Zellen mit einem TCF-Reporter-Plasmid zum Einsatz kommen, konnte Tspan12 die Aktivität des Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs spezifisch verstärken (Junge *et al.* 2009). Eine vermehrte Rezeptorkomplex-Clusterbildung durch Tspan12 scheint hierfür verantwortlich zu sein (vgl. Abb. 2 B; Junge *et al.* 2009).



**Abb. 2: Der Frizzeld-4-Norrin-Signalweg.**

Vereinfachte Darstellung des Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs: A: Konstellation vor Bindung von Norrin an den Frizzeld-4-Rezeptor. B: Situation nach Bindung von Norrin an den Rezeptor. Nach Ohlmann und Tamm (Ohlmann & Tamm 2012).

#### 1.1.4.2.1 Inhibitoren der GSK-3 $\beta$

Die GSK-3 $\beta$  („Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ “) ist als Teil des Degradationskomplexes am Abbau von  $\beta$ -Catenin maßgeblich beteiligt, während der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inaktiv ist (vgl. 1.1.4.2). Somit kann durch die Inhibition der GSK-3 $\beta$  der Wnt-Signalweg ebenfalls aktiviert werden (Sato *et al.* 2004). In Versuchen mit Lithiumchlorid (LiCl) konnte gezeigt werden, dass Lithium die GSK-3 $\beta$  inhibiert (Klein & Melton 1996). Lithium vermittelt seine Wirkung auf die GSK-3 $\beta$  durch kompetitive Hemmung von  $Mg^{2+}$  (Ryves & Harwood 2001). Neben Lithium, können auch einige organische, niedermolekulare Verbindungen die GSK-3 $\beta$  inhibieren (Cohen & Goedert 2004). Ein Beispiel ist das zellpermeable Indolylmaleimid-Derivat SB216763, das die GSK-3  $\beta$  durch ATP-Kompetition selektiv inhibiert (Coghlan *et al.* 2000).

#### 1.1.5 Funktionelle Eigenschaften von Norrin

In den letzten Jahren konnten in verschiedenen Arbeiten unterschiedliche funktionelle Eigenschaften von Norrin aufgedeckt werden (Ohlmann & Tamm 2012). So deuten zahlreiche Befunde an Norrin-defizienten Mäusen (*Ndp*<sup>+/−</sup>; vgl. 1.1.1 und 1.1.4.2) auf eine wichtige Rolle von Norrin bei der retinalen Angiogenese (vgl. 1.2) hin (Ohlmann & Tamm 2012). Untersuchungen an *Ndp*<sup>+/−</sup>-Mäusen zeigten persistierende Hyaloidgefäße, eine stark verzögerte Bildung des oberflächlichen retinalen Gefäßplexus, eine fehlende Formation des mittleren und äußeren retinalen Gefäßnetzes sowie die Bildung fenestrierter Kapillaren (Luhmann *et al.* 2005a; Ohlmann *et al.* 2005; Ohlmann *et al.* 2004; Richter *et al.* 1998; Zuercher *et al.* 2012). Da *Fzd4*- und *Lrp5*-Knockout-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp ausbilden, scheint die Wirkung von Norrin auf die retinale Angiogenese über den Norrin/Frizzled-4-Signalweg (vgl. 1.1.4.2) vermittelt zu werden (Ye *et al.* 2010). Mittels Kreuzung der Norrin-defizienten Mäuse mit transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, welche eine ektope Überexpression von Norrin in der Linse besitzen, konnte in einer Studie die Bildung des normalen retinalen Gefäßnetzes wiederhergestellt werden (Ohlmann *et al.* 2005). Die oben bereits erwähnte Ausbildung fenestrierter Kapillaren in der Netzhaut von *Ndp*<sup>+/−</sup>-Mäusen geht einher mit der Undichtigkeit der retinalen Gefäße sowie der Expression von Plvap („Plasmalemma vesicle associated protein“) und spricht somit dafür, dass Norrin an der Formation der Blut-Retina-Schranke beteiligt ist (Luhmann

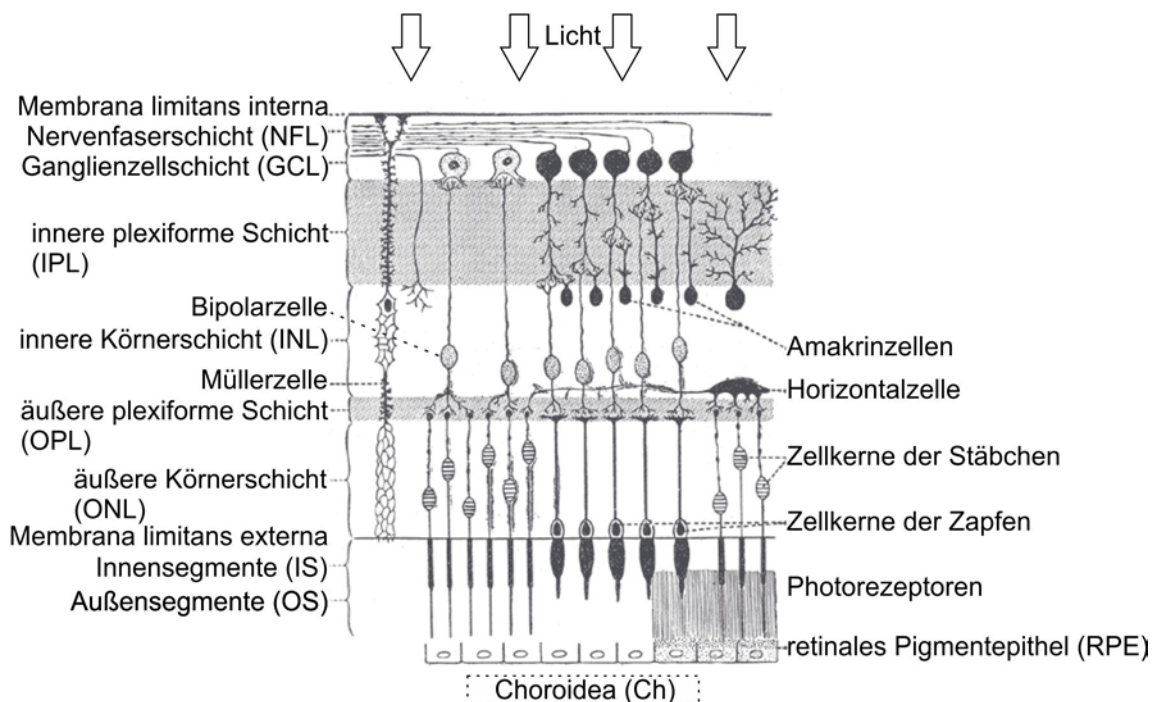
*et al.* 2005a; Richter *et al.* 1998; Schäfer *et al.* 2009). In der normal entwickelten Netzhaut wird die Blut-Retina-Schranke der inneren Retina von einem kontinuierlichen Endothel mit *Tight Junctions* ausgebildet und es wird kein Plvap exprimiert, da dieses nur eine Strukturkomponente fenestrierter Endothelien ist (Cunha-Vaz 2010; Stan *et al.* 1999). Eine aktuelle Arbeit konnte nun, mit Hilfe von konditionellen Frizzled-4-Knockout-Mäusen und dem konditionellen Knockin von Norrin in Norrin-defiziente Mäuse, die Notwendigkeit des intakten Norrin-Frizzled-4-Signalwegs für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke demonstrieren (Wang *et al.* 2012). Außerdem konnte eine andere Studie, durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mit rekombinantem Norrin, die Proliferation, Viabilität, Migration und *Tube Formation* mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro* signifikant steigern (Ohlmann *et al.* 2010). Um ferner zu testen, ob das angiogen wirkende Norrin bei retinalen Gefäßerkrankungen eine Reparaturfunktion übernehmen kann, wurden die weiter oben genannten transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäuse sowie transgene Mäuse mit einer Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel (Rpe65-Norrin) im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie untersucht (vgl. 1.2.4; Ohlmann *et al.* 2010). Nach Hyperoxie-Exposition war, im Vergleich zu Wildtypmäusen, der Verlust an retinalen Kapillaren dabei in beiden transgenen Mauslinien wesentlich kleiner und die Ausbildung von intraretinalen Kapillaren signifikant erhöht (Ohlmann *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde in den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, neben einer signifikant verstärkten anatomisch korrekten Rückbildung der Gefäße, die pathologische Neovaskularisation unterdrückt (Ohlmann *et al.* 2010). Diese angiogenen Effekte konnten durch Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs aufgehoben werden (Ohlmann *et al.* 2010). Norrin scheint aber nicht nur für die retinale Angiogenese von Bedeutung zu sein, da bei *Ndp*<sup>y/-</sup>-Mäusen auch Gefäßveränderungen in der *Stria vascularis* des Innenohrs, mit einem progressiven Verlust von bis zu zwei Dritteln der Gefäße, beschrieben wurden (Rehm *et al.* 2002). Neben der Störung der Gefäßentwicklung, weisen die *Ndp*<sup>y/-</sup>-Mäuse auch eine Desorganisation der retinalen Ganglienzellschicht (Berger *et al.* 1996) und einen progressiven Ganglienzellverlust auf (Richter *et al.* 1998). Auch ein Verlust der äußeren plexiformen Schicht und der Außensegmente der Photorezeptoren wurde gelegentlich gefunden (Berger *et al.* 1996). Analysen ergaben zudem ein verändertes Elektroretinogramm (ERG) und eine progressive Erblindung (Ruether *et al.* 1997). Bei einer Kreuzung der *Ndp*<sup>y/-</sup>-Mäuse mit transgenen Mäusen, die Norrin in der Linse

überexprimieren, konnte die neuronale Funktion der Netzhaut wiederhergestellt und die Zahl der retinalen Ganglienzellen (RGC) im Vergleich zu Wildtypmäusen sogar signifikant gesteigert werden (Ohlmann *et al.* 2005). In den Mäusen mit der ektopen Norrin-Überexpression, die ebenfalls eine erhöhte RGC-Zahl entwickeln, wurde eine erhöhte Proliferation retinaler Progenitorzellen nachgewiesen (Ohlmann *et al.* 2005). Eine aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass die Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs die *Ndp*-Expression in neuronalen Progenitorzellen der Netzhaut in Gang setzt, was wiederum die Proliferation dieser Zellen induziert (McNeill *et al.* 2013). Überdies wurde bei *in vitro*-Versuchen eine durch Norrin vermittelte Abschwächung der Apoptose immortalisierter retinaler Ganglienzellen (RGC-5) festgestellt (Lin *et al.* 2009). Die neuroprotektive Eigenschaft von Norrin konnte auch *in vivo* im NMDA-Schadensmodell (vgl. 1.3.1) beobachtet werden, in welchem die Verabreichung von Norrin die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-vermittelte, exzitotoxische Schädigung retinaler Ganglienzellen in der Maus signifikant unterdrücken konnte (Seitz *et al.* 2010). Durch DKK-1 konnte dieser Effekt (vgl. 1.1.4) blockiert werden (Seitz *et al.* 2010). Somit scheint Norrin seine neuroprotektive Wirkung über die Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zu vermitteln. Weiterhin wurde festgestellt, dass Norrin, bei Schädigung der retinalen Ganglienzellen der Maus, die Expression von Lif („Leukemia inhibitory factor“) und Edn2 („Endothelin 2“), aber auch von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie Bdnf („Brain-derived neurotrophic factor“) oder Fgf2 („Fibroblast growth factor 2“), in der Retina steigert (Seitz *et al.* 2010). Zudem konnte bei primären Müllerzellen der Ratte durch Norrin die Expression von Lif und neurotrophen Wachstumsfaktoren wie Fgf2 signifikant induziert werden (Seitz *et al.* 2010). Basierend auf diesen Befunden sowie auf Arbeiten, welche die Degeneration von Photorezeptoren untersuchten (Joly *et al.* 2008; Rattner & Nathans 2005), wurde ein hypothetisches Modell für den neuroprotektiven Wirkungsmechanismus von Norrin entwickelt. Demnach bilden die Müllerzellen, durch Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, bei neuronaler Schädigung vermehrt Lif, was retinale Ganglienzellen oder Photorezeptoren zu einer gesteigerten Sekretion von Edn2 veranlasst und in der Folge die Müllerzellen aktiviert, welche ihrerseits, zusätzlich stimuliert durch Norrin, in einem erhöhten Maße neurotrophe Wachstumsfaktoren wie Fgf2 exprimieren (Ohlmann & Tamm 2012; Seitz *et al.* 2010). In einer kürzlich erschienen Studie an transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel (Rpe65-Norrin) konnte zudem demonstriert

werden, dass Norrin über Aktivierung des Norrin/ $\beta$ -Catenin- und des Endothelin 2-Signalwegs die Apoptose von Photorezeptoren durch einen Lichtschaden verhindert (Braunger *et al.* 2013).

## 1.2 Gefäßentwicklung in der Netzhaut

### 1.2.1 Aufbau der Netzhaut



**Abb. 3: Schichten und Zelltypen der Netzhaut des Menschen.**

Schematische Darstellung der Retina. Modifiziert nach Gray und Lewis (Gray & Lewis 2000).

Betrachtet man einen Schnitt durch die Netzhaut des Menschen (vgl. Abb. 3), so lassen sich 10 Schichten unterscheiden (Lang 2008). Eine identische Schichtung findet sich auch in der Retina der Maus. Die äußerste Schicht hinter der Choroidea bildet das einschichtige retinale Pigmentepithel, welches Lichtreflexionen minimiert (Gekle 2010). Es folgt eine Schicht mit den Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren, die in Stäbchen und Zapfen unterschieden werden. In den Außensegmenten der Photorezeptoren findet die Phototransduktion, die Umwandlung von Lichtquanten in elektrochemische Signale, statt (Wehner *et al.* 1995). Die Schicht mit den Außen- und Innensegmenten wird begrenzt durch die *Membrana limitans externa*, einer siebartigen Platte aus Müllerzellfortsätzen die von den Photorezeptoren

ren passiert wird (Lang 2008). Weiter innerhalb der Retina befindet sich die äußere Körnerschicht mit den Zellkernen der Stäbchen und Zapfen. Eine Ebene höher, in der äußeren plexiformen Schicht, werden die Dendriten von Bipolar- und Horizontalzellen mit Axonterminalen der Photorezeptorzellen verschaltet. Oberhalb, in der inneren Körnerschicht, sind die Zellkerne von Amakrin-, Bipolar-, Horizontal- und Müllerzellen lokalisiert. Die synaptischen Enden der Horizontalzellen werden in der inneren plexiformen Schicht mit den Dendriten der retinalen Ganglienzellen verschaltet. Darüber hinaus finden sich in diesem Abschnitt der Netzhaut Synapsen mit den Amakrinzellen (Lüllmann-Rauch 2012). Die Amakrinzellen, wie auch die Horizontalzellen, bewirken durch horizontale Verschaltung eine Signalverarbeitung, die als laterale Inhibition bekannt ist und Kantenverschärfung sowie Kontrastverstärkung bewirkt (Campbell 1997). Noch weiter innen in der Netzhaut beherbergt die Ganglienzellschicht die Zellkerne und die aufgelagerte Nervenfaserschicht die Axone der Neuronen. Die Axone der retinalen Ganglienzellen bilden den *Nervus opticus* und enden im *Corpus geniculatum lateralis* (Campbell 1997). Durch die *Membrana limitans interna* wird die Netzhaut schließlich vom Glaskörper abgegrenzt (Lang 2008). Wie auch schon die *Membrana limitans externa*, wird auch diese Grenzmembran von den Müllerzellen gebildet, welche sich säulenförmig durch die Netzhaut erstrecken (Rohen & Lütjen-Drecoll 2000).

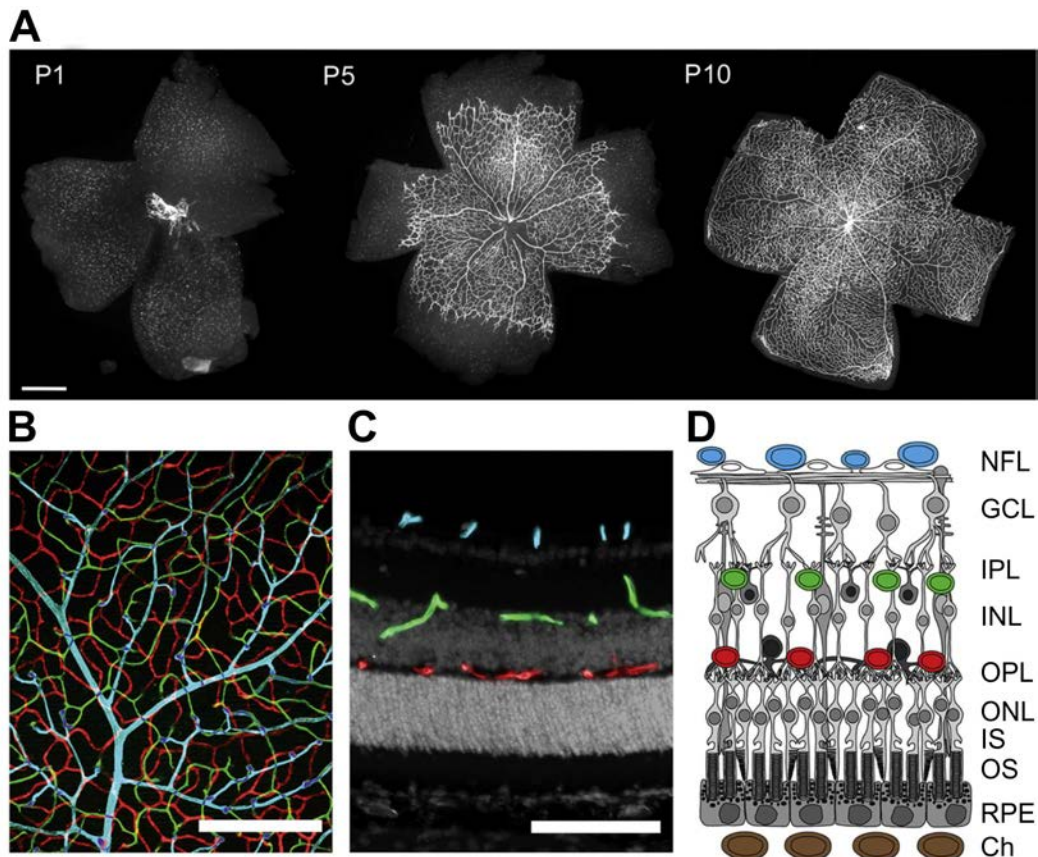
### 1.2.2 Bildung der intraretinalen Gefäßplexus

Die Versorgung der Netzhaut wird von zwei Blutgefäßsystemen übernommen. Über die Choriokapillaris der Choroidea wird das äußere Drittel und über die intraretinalen Gefäße werden die inneren zwei Drittel der Retina versorgt (Chan-Ling 2010). Drei Plexus werden während der Gefäßentwicklung in der Netzhaut des Menschen und der Maus angelegt (vgl. Abb. 4 B-D). In der Nervenfaserschicht befindet sich der oberflächliche Gefäßplexus, zwischen der inneren plexiformen Schicht und der inneren Körnerschicht der mittlere Plexus und zwischen der inneren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht der äußere Plexus (vgl. Abb. 4 C, D). Die Entwicklung erfolgt im Menschen zwischen sechzehnter Gestationswoche und Geburt, während sie in der Maus erst mit der Geburt beginnt und drei Wochen danach abgeschlossen ist (Stahl *et al.* 2010). Beim Menschen werden in der Entwicklung des oberflächlichen Plexus zunächst durch Vaskulogenese primordiale Gefäße in der

zentralen Retina gebildet (Hughes *et al.* 2000). Hierbei kommt es, ausgehend vom Sehnervenkopf, zu einer Neubildung von Gefäßen aus Angioblasten (Heckmann 2008; McLeod *et al.* 2006). Der Prozess der Angiogenese (die Sprossung von neuen Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen) übernimmt eine überragende Bedeutung bei der weiteren radiären Ausbreitung des oberflächlichen Plexus in die Peripherie der Retina und bei der Reifung des Gefäßnetzes (Heckmann 2008). Astrozyten, die in die Nervenfaserschicht einwandern (Watanabe & Raff 1988), bilden dabei eine Leitstruktur für das Gefäßwachstum (Dorrell *et al.* 2002). Hypoxie in den avaskulären Netzhautarealen aktiviert den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  in Astrozyten und induziert die Expression von VEGF („Vascular endothelial growth factor“) (Kubota & Suda 2009). VEGF stimuliert die Angiogenese, in dem es die Proliferation und Migration retinaler Endothelzellen in Gang setzt (Dorrell & Friedlander 2006). Des Weiteren werden die endothelialen Filopodien an der Wachstumsfront der Gefäße durch die Bindung von VEGF an ihre VEGF-Rezeptoren gefestigt (Dorrell & Friedlander 2006). Hierzu trägt auch die Adhäsion an die Astrozyten bei, welche über astrozytäres R-Cadherin vermittelt wird (Dorrell *et al.* 2002; Dorrell & Friedlander 2006). Bei der Maus ist die sprossende Angiogenese an der Entstehung des oberflächlichen Gefäßplexus (zwischen postnatalem Tag (P)1 und P10, vgl. Abb. 4 A), maßgeblich beteiligt (Dorrell & Friedlander 2006). Ob an diesem Prozess auch Vasculogenese eine Rolle spielt, scheint nicht endgültig geklärt (Kubota & Suda 2009).

Die Bildung des mittleren und des äußeren Plexus wird, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus, durch Angiogenese vermittelt (Dorrell & Friedlander 2006; Gariano 2003). Vom oberflächlichen Plexus der menschlichen Netzhaut sprossen Gefäße in die Tiefe und bilden zunächst den mittleren und dann den äußeren Plexus (Gariano 2003). Beide Plexus breiten sich vom Sehnerv radiär in die periphere Netzhaut aus (Gariano 2003). In der Maus wird, im Unterschied zum Menschen, zunächst das äußere Gefäßnetz (P8-P12) und erst dann der mittlere Gefäßplexus (P14-P20) ausgebildet (Dorrell & Friedlander 2006). Die Angiogenese-vermittelte Bildung intraretinaler Gefäße wird vermutlich durch VEGF-Expression von Müllerzellen in der inneren Körnerschicht angeregt (Dorrell & Friedlander 2006; Heckmann 2008; Stone *et al.* 1995).





**Abb. 4: Gefäßentwicklung in der Netzhaut der Maus.**

A: Häutchenpräparate von Mausretinae 1, 5 oder 10 Tag(e) postnatal (P). Die Gefäße der Retinae (A, B, C) sind mit Hilfe von Isolektin-B4 sichtbar gemacht. B, C: Visualisierung der 3 retinalen Gefäßplexus im retinalen Flachpräparat (B) und im Kryoschnitt einer adulten Maus. Die einzelnen Plexus sind künstlich eingefärbt (blau: oberflächlicher Gefäßplexus, grün: mittlerer Gefäßplexus, rot: äußerer Gefäßplexus; in C, D). D: Schematischer Schnitt durch die Netzhaut. Der oberflächliche Plexus in der Nervenfaserschicht, der mittlere Plexus an der inneren Grenze der inneren Körnerschicht (INL), der äußere Plexus an der äußeren Grenze der INL und die Choroidea (Ch; braun) sind farblich hervorgehoben. Messbalken: 500 µm (A), 200 µm (B), 100 µm (C). Modifiziert nach Caprara und Grimm (Caprara & Grimm 2012).

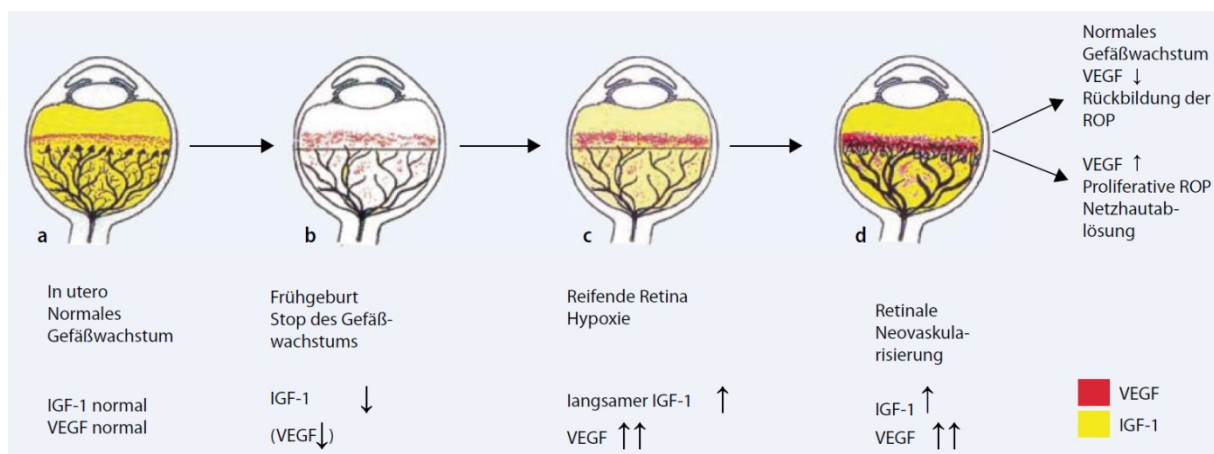
### 1.2.3 Der proangiogene Faktor IGF-1

Beim Menschen kodiert das Gen *IGF-1* auf Chromosom 12 für den Wachstumsfaktor „Insulin-like growth factor 1“ (IGF-1) (Tricoli *et al.* 1984). In der Maus ist das *Igf-1*-Gen auf Chromosom 10 lokalisiert (Taylor & Grieco 1991). IGF-1 ist maßgeblich an der Entwicklung vor und nach der Geburt beteiligt (Delafontaine 1995). Das ubiquitäre Peptid kann seine Wirkung endokrin, autokrin oder auch parakrin vermitteln (Delafontaine *et al.* 2004). Von der Leber wird, reguliert durch das Wachstumshormon, das zirkulierende IGF-1 sezerniert (Delafontaine *et al.* 2004). Wie in anderen Organen, kommt es auch im Auge zu einer lokalen Produktion von IGF-1, die unter

anderem in retinalen Pigmentepithelzellen, retinalen Perizyten, Endothel-, Müller- und Ganglienzellen erfolgt (Sall *et al.* 2004). IGF-1 vermittelt seine Wirkung über Bindung an den IGF-1-Rezeptor (IGF-1R), welche über sechs verschiedene IGF-Bindeproteine (IGFBP) moduliert wird (LeRoith *et al.* 1995). IGF-1 spielt bei der Entwicklung von retinalen Gefäßen eine wichtige Rolle. So zeigen IGF-1-Knockout-Mäuse ein deutlich verzögertes Auswachsen der retinalen Gefäße (Hellstrom *et al.* 2001), was die Bedeutung von IGF-1 für die Vaskularisation der Netzhaut unterstreicht. Der Wachstumsfaktor IGF-1 verstärkt die VEGF-vermittelte Proliferation von retinalen Endothelzellen, die über den MAPK („Mitogen-activated protein kinase“)-Signalweg erfolgt (Hellstrom *et al.* 2001; Smith *et al.* 1999). Außerdem konnte via *in vitro*-Experimente mit Endothelzellen aus der Netzhaut nachgewiesen werden, dass ein niedriger IGF-1-Spiegel die VEGF-induzierte Akt-Phosphorylierung unterbindet und so das Überleben von Endothelzellen negativ reguliert (Hellstrom *et al.* 2001). Auf Grund dieser Eigenschaften spielt IGF-1, auch bei Erkrankungen mit pathologischer Angiogenese wie der diabetischen Retinopathie (Smith *et al.* 1999) oder der *Retinopathia praematurorum* (Hellstrom *et al.* 2001), eine wichtige Rolle.

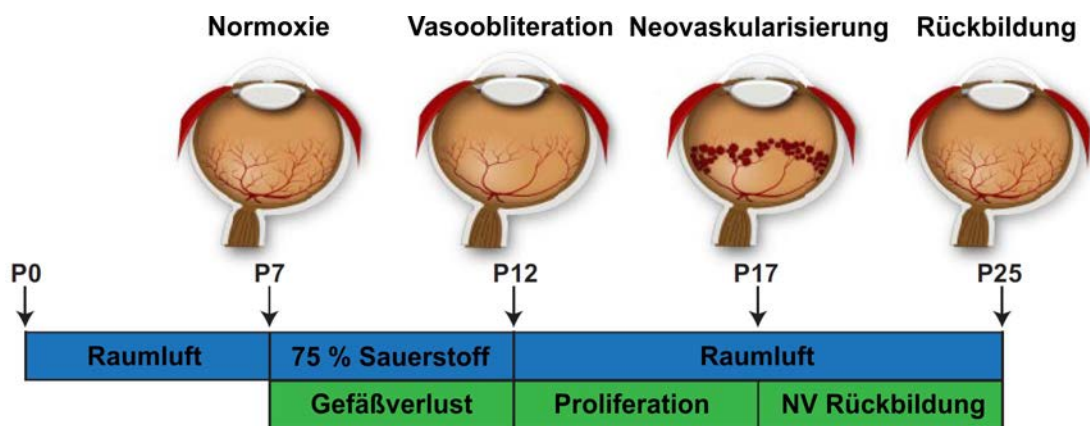
#### 1.2.4 Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR)

Bei der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) handelt es sich um ein Mausmodell der *Retinopathia praematurorum* (ROP) des Menschen.



**Abb. 5: Die Rolle von VEGF und IGF-1 bei der Pathogenese der *Retinopathia praematurorum*.**  
Nach Hellstrom *et al.* in der Modifikation von Heckmann (Heckmann 2008; Hellstrom *et al.* 2001).

Die ROP ist eine Erkrankung, die bei Frühgeborenen auftritt (Heckmann 2008) und deren Pathogenese sich in zwei Phasen einteilen lässt (Hellstrom *et al.* 2001). In beiden Phasen spielen IGF-1 und VEGF eine zentrale Rolle (Chen & Smith 2007). Wie in Abb. 5 dargestellt, kommt es bei der Versorgung von Frühgeborenen mit einer erhöhten Sauerstoffkonzentration, zu einer reduzierten VEGF-Expression (Chen & Smith 2007). Im Zusammenspiel mit einem erniedrigten IGF-1-Spiegel, der aus einer fehlenden Versorgung über die Plazenta und das Fruchtwasser resultiert, kommt das retinale Gefäßwachstum zum Erliegen (Hellstrom *et al.* 2001). Außerdem werden bereits bestehende Gefäße zurückgebildet und es entsteht eine Vasoobliteration, welche die erste Phase der ROP charakterisiert (Heckmann 2008). Die zweite Phase ist geprägt von einer, durch Hypoxie in den vasoobliterierten Bereichen induzierten, retinalen Neovaskularisierung (Chen & Smith 2007). Ein Grund hierfür ist eine gesteigerte VEGF-Expression in den hypoxischen Arealen (Pierce *et al.* 1995). Die pathologische Neovaskularisation wird durch einen langsamen Anstieg des IGF-1-Spiegels verstärkt (Hellstrom *et al.* 2001). Dies kann durch die permissive Eigenschaft von IGF-1 im Bezug auf die Wirkung von VEGF erklärt werden (vgl. 1.2.3). Bleibt die VEGF-Expression im weiteren Verlauf erhöht, kann es im gravierensten Fall zum Einwachsen von Gefäßen in den Glaskörper und schlussendlich zu einer Netzhautablösung kommen (Heckmann 2008).



**Abb. 6: Das Hyperoxie-induzierte ROP-Mausmodell.**

Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Modells sowie den Veränderungen in der retinalen Gefäßentwicklung. Modifiziert nach Connor *et al.* (Connor *et al.* 2009).

Das OIR-Mausmodell bildet beide Phasen der Pathogenese der ROP des Menschen nach (Stahl *et al.* 2010). Wie in Abb. 6 schematisch dargestellt, werden bei diesem Mausmodell Mäuse, 7 Tage nach der Geburt (P7), zusammen mit ihrer Mutter für 5

Tage einem Sauerstoffgehalt von 75 % ausgesetzt. In dieser Zeit entwickelt sich in der zentralen Retina ein vasoobliterierter Bereich. Nach Rückkehr an die Raumluft an P12, kommt es zu einer Hypoxie-induzierten pathologischen Neovaskularisierung, die ihr Maximum an P17 erreicht. Die Zeit zwischen P17 und P25 ist gekennzeichnet von der Rückbildung der pathologischen Neovaskularisierung (NV). Anders als bei der ROP des Menschen, kommt es beim OIR-Mausmodell zu keiner Netzhautablösung (Heckmann 2008).

## **1.3 Modelle für die Schädigung retinaler Ganglienzellen**

### **1.3.1 Das NMDA-Schadensmodell**

Mit Hilfe des NMDA-Schadensmodells konnte das neuroprotektive Potential von Norrin erstmals nachgewiesen werden (Seitz *et al.* 2010). Die intravitreale Injektion des Glutamat-Analogons N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) in Mäusen führt zur exzitotoxischen Schädigung und Apoptose retinaler Ganglienzellen (Li *et al.* 1999). NMDA ist ein Agonist, der, wie das körpereigene Glutamat, an die tetrameren NMDA-Rezeptoren, einen spezifischen Typ der ionotropen Glutamatrezeptoren, bindet und diese aktiviert (Slaughter 2010). Eine exzessive Stimulierung von Glutamatrezeptoren, insbesondere von durch NMDA aktivierbaren, spielt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder auch beim Glaukom eine wichtige Rolle (Lipton 2006). Die Hyperaktivierung von NMDA-Rezeptoren, wie sie durch NMDA vermittelt wird, führt zu einem erhöhten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen, zur Bildung toxischer freier Radikale und setzt proteolytische Prozesse in Gang (Lipton 2006). Welche Prozesse genau zum NMDA-induzierten Untergang von retinalen Ganglienzellen führen, ist jedoch nicht vollständig geklärt (Shen *et al.* 2006).

### **1.3.2 Das DBA/2J-Mausmodell**

Im Gegensatz zur akuten, exzitotoxischen Schädigung durch NMDA kann am DBA/2J-Mausmodell die chronisch progrediente Degeneration retinaler Ganglienzellen studiert werden (Libby *et al.* 2005a). DBA/2J Mäuse zeigen, meist ab einem Alter

von 9 Monaten, einen erhöhten Augeninnendruck und entwickeln in der Folge ein Sekundärglaukom mit fortschreitendem Verlust retinaler Ganglienzellen, das dem Pigmentdispersionsglaukom beim Menschen ähnelt (John *et al.* 1998; Libby *et al.* 2005a; Schuettauf *et al.* 2004; Spencer 1996). Verantwortlich hierfür sind rezessive Mutationen in den Genen *Gpnmb* („Glycoprotein (transmembrane) nmb“) und im *Tyrp1* („Tyrosinase-related protein 1“), welche eine Pigmentdispersion der Iris und eine Atrophie des Irisstromas auslösen (Anderson *et al.* 2002; Chang *et al.* 1999). DBA/2J Mäuse entwickeln zudem eine Iristransillumination (Kirchenfensterphänomen) an Stellen mit Schäden im Iripigmentblatt und vordere Synechien (John *et al.* 1998). Die Hinderung des Kammerwasserabflusses durch Ansammlung von Pigmentepithelzell-Abrieb in der Vorderkammer und die Verwachsungen von Iris und Hornhautrückfläche erscheint dabei ursächlich für den Anstieg des intraokularen Drucks (John *et al.* 1998). Der anschließende Untergang der retinalen Ganglienzellen beginnt vermutlich mit der Schädigung der Axone am Sehnervenkopf (Howell *et al.* 2007a).

## 2 Zielsetzung

Die neuroprotektive Wirkung von Norrin *in vivo*, nach exzitotoxischer Schädigung durch NMDA, konnte bei intravitrealer Verabreichung von rekombinantem humanem Norrin gezeigt werden (Seitz *et al.* 2010). Um die chronische Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen zu untersuchen, sollten transgene Mäuse, mit Expression von Norrin unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancerelements des murinen Pax6 Promotors, analysiert werden.

Neben einer neuroprotektiven Eigenschaft vermittelt Norrin auch angiogene Effekte über den kanonischen Wnt-Signalweg (Ohlmann *et al.* 2010). In *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sollte daher der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg durch Inhibitoren der GSK-3 $\beta$  aktiviert werden, um festzustellen, ob eine generelle Stimulation des kanonischen Signalwegs Norrin-ähnliche angiogene Wirkungen erzielt.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der proangiogene Faktor IGF-1, während der retinalen Gefäßentwicklung in Mäusen mit ektopter Überexpression von Norrin ( $\beta$ B1-Norrin Mäuse) im Vergleich zu Wildtypkontrollen, differentiell exprimiert wird. Die Frage, ob IGF-1 an der Vermittlung der angiogenen Eigenschaften von Norrin beteiligt ist, sollte *in vitro* als auch *in vivo* überprüft werden.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

- Die Charakterisierung transgener Mäuse mit einer Überexpression von Norrin in der inneren Netzhaut (Pax6-Norrin).
- Die Analyse des Verlustes retinaler Neuronen in Pax6-Norrin Mäusen nach NMDA-vermittelter, exzitotoxischer Schädigung bzw. bei chronischer Degeneration von retinalen Ganglienzellen in Pax6-Norrin Mäusen im genetischen DBA/2J Hintergrund.
- Die Untersuchung des angiogenen Potentials des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs *in vitro* sowie der Wirkung der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, nach Induktion einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie in der Maus.

- Die Überprüfung Norrin-induzierter Expression von IGF-1 *in vitro* sowie der Vermittlung der protektiven Eigenschaften von Norrin, im Hyperoxie-induzierten ROP-Mausmodell, durch IGF-1.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialliste

#### 3.1.1 Reagenzienliste

Tabelle 1: Übersicht der eingesetzten Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
1,4-p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden bzw. Bioline, Luckenwalde
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Roth, Karlsruhe
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
Azur II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörgl, AUT
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
Casyton	Roche/Innovatis, Bielefeld
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Dig Easy Hyb	Roche, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DKK-1	R&D Systems, Wiesbaden
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM + Glutamax II	PAA, Pasching, AUT
DMEM 4500	PAA, Pasching, AUT
DMSO	Roth, Karlsruhe



dNTPs	Qiagen, Hilden bzw. Bioline, Luckenwalde
EDTA	Roth, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Endothelial Cell Basal Medium MV	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix	PromoCell, Heidelberg
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FBS	Life Technologies, Paisley, UK
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelantine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Geneticinsulfat G418	Roth, Karlsruhe
Gentamycin (5 mg/ml)	Life Technologies, Paisley, UK
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether 100	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
Heparin-Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5 ml	Ratiopharm, Ulm
Hygromycin B (50 mg/ml)	Life Technologies, Paisley, UK
Immobilon™Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (MM)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid (MNA)	Roth, Karlsruhe
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS	Roth, Karlsruhe

Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat, Anhydrid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat, Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Life Technologies, Paisley, UK
pCR II-Topo	Life Technologies, Paisley, UK
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Paisley, UK
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Quercetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti®-Free Stripping-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCL)	Merck, Darmstadt
Saustoff 2.5	Linde, München
SB216763	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Stickstoff 2.8	Linde, München
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NED
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Life Technologies, Paisley, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe

WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 Enzyme und Reagenzien-Kits

Tabelle 2: Auflistung der Enzyme und Reagenzien-Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric)	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
HindIII (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HotStarTaq Kit	Qiagen, Hilden
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde

### 3.1.3 Oligonukleotidprimer und DNA-Leiter

Alle hier aufgeführten Oligonukleotidprimer wurden von Life Technologies, Paisley, UK synthetisiert. Die Primersequenzen für quantitative real-time RT-PCR Analysen wurden unter Verwendung des Universal ProbeLibrary Assay Design Centers (Roche Applied Science, Penzberg) bestimmt.

Tabelle 3: Primer für Northern Blot Sonden

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
Norrin	<i>Mus musculus</i>	forward	AGCTCAAAGATGGTGCTCCT
Norrin	<i>Mus musculus</i>	reverse	TAGAGCCAACAGGGGAAATG

Tabelle 4: Genotyisierungsprimer

Primer	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
SV40	forward	gtgaaggaaccttacttctgtggtg
SV40	reverse	gtccttggggtcttctaccttctc

**Tabelle 5: Übersicht der für quantitative real-time RT-PCR Analysen verwendeten Primer**

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
GNB2L1	<i>Homo sapiens</i>	forward	gctactaccccgagttcc
GNB2L1	<i>Homo sapiens</i>	reverse	cagttccacatgatgatggtc
IGF-1	<i>Homo sapiens</i>	forward	tgtggagacaggggcttta
IGF-1	<i>Homo sapiens</i>	reverse	atccacgatgcctgtctga
Gapdh	<i>Mus musculus</i>	forward	tgtccgctcgtggatctgac
Gapdh	<i>Mus musculus</i>	reverse	cctgcttcaccaccttcttg
Igf-1	<i>Mus musculus</i>	forward	caaaagcagcccgtctta
Igf-1	<i>Mus musculus</i>	reverse	tcgataggacggggact
Gapdh	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	aatgtatccgttgatctga
Gapdh	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	gcttcaccaccttctgatgt
Igf-1	<i>Rattus norvegicus</i>	forward	tgacatgcccaagactcaga
Igf-1	<i>Rattus norvegicus</i>	reverse	cgtggcattttctgttctc

Als Größenstandard bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde die GeneRuler 100bp DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt.

### 3.1.4 Antikörper und Molekulargewichtsstandard

**Tabelle 6: Liste der eingesetzten Antikörper für Western Blot Analysen, Dot Blot Analysen, Immunhistochemie und Immunzytochemie**

Antikörper	Hersteller
rabbit-anti- $\beta$ -Catenin	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
goat-anti-IGF-1	R&D Systems, Wiesbaden
mouse-anti-Penta-His	Qiagen, Hilden
AP-konjugierte anti-Digoxigenin	Roche, Mannheim
HRP-konjugierte rabbit-anti-GAPDH	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Peroxidase-konjugierte mouse anti-BrdU	Roche, Mannheim
HRP-konjugierte donkey-anti-goat	Santa Cruz, Heidelberg
HRP-konjugierte goat-anti-rabbit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
HRP-konjugierte horse-anti-mouse	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Biotin-konjugierte goat-anti-rabbit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Alexa Fluor® 488-konjugiertes Streptavidin	Life Technologies, Paisley, UK

Als Molekulargewichtsstandard bei den Western Blot Analysen diente die PageRuler Prestained Protein-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### 3.1.5 Rezepte für Gele, Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel	1 g Agarose 100 ml 1x TBE 5 µl Ethidiumbromid (vor dem Gießen zugeben)
Northern Blot Agarosegel	1,5 g Agarose 109,5 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 15 ml 10x MOPS aufkochen, auf 50 °C abkühlen 25,5 ml Formaldehyd zugeben
1 ml Sammelgel (SDS-Gel)	0,68 ml H <sub>2</sub> O dest. 0,17 ml Rotiphorese® Gel 30 0,13 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,01 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED
5 ml Trenngel 10 % (SDS-Gel)	1,9 ml H <sub>2</sub> O dest. 1,7 ml Rotiphorese® Gel 30 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED
5 ml Trenngel 15 % (SDS-Gel)	1,1 ml H <sub>2</sub> O dest. 2,5 ml Rotiphorese® Gel 30 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED

Tabelle 8: Rezepte der eingesetzten Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer (PhP)	P1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)	121,14 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 6,8
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	181,71 g Tris ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8,8

10 % SDS-Lösung	10g SDS ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest.
10x DIG Blocking Reagent	50 g DIG Blocking Reagent 500 ml Maleinsäurepuffer unter Erhitzen lösen
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O dest. lösen
10x MOPS	200 mM MOPS 80 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0; sterilfiltriert
10x PBS	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumhydrogenphosphat 2,4 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest., pH 7,4; autoklavieren
10x TBE	108 g Tris 55 g Borat 40 ml 0,5 M EDTA ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.; pH 8
10x TBS	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit HCl auf pH 7,4 (20 °C) einstellen ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.; autoklavieren
10x Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
1x TBST	100 ml 10x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1l mit H <sub>2</sub> O dest.
20x SSC	175,3 g Natriumchlorid 88,2 g Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,5 (20 °C) einstellen ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4

4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA 100 ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
4x Auftragspuffer für Agarosegel	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 15 % (w/v) Ficoll
4x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT bzw. 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Cacodylatpuffer	10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H <sub>2</sub> O pH 7,2
Coomassie-Entfärbelösung	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure 0,2 g Coomassie®Brillant Blue R-250 ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % Diethylpyrocarbonat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. ün 37 °C; autoklavieren
Einfriermedium	5 ml DMSO 10 ml FBS 35 ml DMEM 4500
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Entwicklungslösung	25 g Natriumcarbonat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. erst kurz vor Gebrauch 20 $\mu$ l Formaldehyd (pro 50 ml) zugeben
Fixierlösung I	400 ml Ethanol 100 ml Essigsäure ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
Fixierlösung II	300 ml Ethanol 68 g Natriumacetat 2 g Natriumthiosulfat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. erst kurz vor Gebrauch 0,25 ml Glutaraldehyd (pro 50 ml) zugeben

Gebrauchslösung (Richardson)	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile H <sub>2</sub> O dest.
Konservierungslösung	300 ml Ethanol 40 ml Glycerin ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M Natriumchlorid mit NaOH auf pH 7,5 (20 °C) einstellen
Maleinsäurewaschpuffer	1 l Maleinsäurepuffer 3 ml Tween 20
Mausschwanz-Lysepuffer	50 mM Kaliumchlorid 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM Magnesiumchlorid 0,1 mg/ml Gelatine 0,45 % Nonidet P-40 0,45 % Tween 20 Proteinase K (500 µg/ml)
Methylenblau-Lösung	0,03 % (w/v) Methylenblau 0,3 M Natriumacetat pH 5,2
Northern-Proben-Puffer	110 µl DEPC-H <sub>2</sub> O 50 µl 10x MOPS 90 µl Formaldehyd 250 µl Formamid
Paraphenylendiamin	500 mg Paraphenylendiamin 50 ml Ethanol
RIPA-Puffer	150 mM Natriumchlorid 1 % (v/v) Tergitol 0,5 % (w/v) Deoxycholsäure 0,1 % (w/v) SDS 50 mM Tris (pH 8,0)
Silberlösung	2,5 g Silbernitrat ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest. erst kurz vor Gebrauch 40 µl Formaldehyd (pro 50 ml) zugeben
Stammlösung A (Epon)	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA
Stammlösung B (Epon)	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA
Stammlösung I (Richardson)	5 g Azur II 500 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stammlösung II (Richardson)	5 g Methylenblau 500 ml 1 % Borax (Natriumtetraborat)
Stopplösung	15 g EDTA-Dinatriumsalz ad 1 l mit H <sub>2</sub> O dest.



### 3.1.6 Materialien und Geräte

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und Materialien**

Bezeichnung	Bezugsquelle
25 µl Hamiltonspritze	Roth, Karlsruhe
abgeschrägte 35 Gauge Injektionskanüle	W. P. I., Berlin
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Axio Imager.Z1 mit ApoTome Zusatzmodul	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen
Casy Zellzähler	Roche/Innovatis, Bielefeld
Cell Observer	Carl Zeiss, Göttingen
Crosslinker	Stratagene, Cedar Creek, USA
Druckminderer für Sauerstoff bzw. Stickstoff	KAYSER GmbH, Plaidt/Koblenz
Einbettautomat EM TP	Leica, Wetzlar
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Hybridizer HB-1000	UVP Laboratory Products, Upland, USA
IKA combimag RET Heizplatte	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Innova 4200 Inkubator	New Brunswick, Edison, USA
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Roskilde, DEN
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler Gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Messumformer für Luftsauerstoff OXY 3690	GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Mikrohomonisator	Roth, Karlsruhe
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Minifold I-SRC96-Dot Blot	Schleicher & Schüll, Dassel
Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDROP 2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, NED
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, NED
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Supply	Consort, Turnhout, BEL
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Roller mixer SRT2 Stuart®	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Sauerstoffelektrode GGO 369 MU	GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stemi 2000-CS	Carl Zeiss, Göttingen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TonoLab Tonometer	Tioloat Oy, Helsinki, FIN
Transilluminator	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Ultracut E-Ultramikrotom	Reichert-Jung, Kirchseeon
Vertikale Gelelektrophoresekommer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
3MM Blotting ("Whatman")-Papiere	Neolab, Heidelberg
BD Falcon Cultureslides, 4-Chambers	BD Bioscience, Heidelberg
BD microlance Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritze	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
EasyFlasks Nunclon™ Δ T25, T75	Nunc, Roskilde, DEN
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München

Microseal® B' Film	BioRad, München
Multidishes Nunclon™ Δ 6-Well	Nunc, Roskilde, DEN
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Nylon-Membran	Roche, Mannheim
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 Well iCycler IQ	BioRad, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen Chromatographiesäulen	BioRad, München
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUT
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spectra Por7 Dialyseschlauch (MWCO 3500)	Spectrum Medical Industries, Houston, USA
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tissue Culture Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
TripleFlasks	Nunc, Roskilde, DEN
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

## 3.2 *In vitro* Versuche

### 3.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Im Umgang mit den Zellen wurde stets auf steriles Arbeiten geachtet. Daher wurde mit den Zellen generell unter der Hera Safe Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) gearbeitet. Es wurden sterile Plastikwaren eingesetzt und die verwendeten Glasgegenstände wurden zuvor autoklaviert. Sämtliche für die Zellkultur benutzten Lösungen und Puffer waren sterilfiltriert. Alle Zellen wurden unter konstanten Bedingungen (konstante Temperatur und konstanter CO<sub>2</sub>-Gehalt in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre) in Hera Cell 150 Brutschränken (Heraeus, Hanau) kultiviert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums fand immer montags, mittwochs und freitags statt.

Bei Erreichen der Konfluenz (dichter Zellrasen bedeckt Oberfläche des Zellkulturgefäßes vollständig) wurden Zellen passagiert und so von einem Zellkulturgefäß auf mehrere aufgeteilt. Für das Passagieren wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und der Zellrasen dann vollständig mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA (0,05 %) bedeckt. Hierdurch wurden die adhärenen Zellen von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Nach vollzogener Loslösung nahezu aller Zellen von der Oberfläche wurde dieser Prozess durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem Medium gestoppt. Die gelösten Zellen wurden alsdann in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert und 5 min bei 1000 UpM pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in serumhaltigem Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (vgl. 3.2.5) und die Zellen auf neue Zellkulturgefäße ausgesät. Für die Versuche wurden primäre Müllerzellen nur bis einschließlich Passage 3 und die primären mikrovaskulären Endothelzellen nur bis einschließlich Passage 6 verwendet.

Um Zellen für spätere Versuche aufzubewahren, wurden diese kryokonserviert. Hierzu wurden Zellen, wie für das Passagieren beschrieben, pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Einfriermedium (vgl. 3.1.5) gelöst und in Kryoröhrchen transferiert. In einem Kryo-Einfriergerät (Nunc, Roskilde, DEN), gefüllt mit Isopropanol, wurden die Zellen dann bei -80 °C schrittweise (Reduktion um 1 °C pro min) heruntergekühlt. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen zur dauerhaften Konservierung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff verlegt.

Zum Auftauen von kryokonservierten Zellen, wurden die Kryoröhrchen in ein Wasserbad mit 37 °C eingetaucht. Die Zellen wurden sodann in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 9 ml serumhaltigen Medium vermischt und 5 min bei 1000 UpM pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und auf eine Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (EasyFlasks Nunclon™) ausgesät.

Bei Zellbehandlungen wurde immer mit serumfreiem Medium gearbeitet, wobei Zellen, die ausschließlich mit diesem Medium inkubiert wurden, als Kontrollen dienten. Im Vorfeld der Behandlungen wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und, falls nicht anders vermerkt, üN in serumfreiem Medium gehalten, welches zur Behandlung nochmal gewechselt wurde. Durch dieses Vorgehen wurde verhindert, dass Wachstumsfaktoren aus dem Serum die Behandlungen beeinträchtigten.

### 3.2.2 Isolation und Kultivierung von Müllerzellen

Primäre Müllerzellen der Ratte wurden nach einer etablierten Methode (Hicks & Courtois 1990) isoliert. Hierzu wurden aus jungen Ratten (P8-P12) Augen entnommen (vgl. 3.3.2.2), mit einer Kanüle ein Loch in jede Cornea gestochen und die Augen in einer Petrischale mit Müllerzellmedium (vgl. Tabelle 11) bei 4 °C üN inkubiert. Anschließend wurden die Augen 3x mit PBS gewaschen und 30 min bei 37 °C mit einer Verdauung (2 ml DMEM + GlutaMax™-II, 500 µl Trypsin/EDTA (0,05 %), 15 µl Collagenase A) behandelt. Der Verdau wurde durch Waschen mit Müllerzellmedium abgestoppt, die Augen sodann in eine Petrischale mit PBS (auf Eis) transferiert, die Retinae präpariert und in eisgekühltem PBS gesammelt. Daraufhin wurden die Retinae durch Auf- und Abpipettieren zerkleinert, 5 min bei 1000 UpM pelletiert und das Pellet in Müllerzellmedium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (EasyFlasks Nunclon™) ausgesät (gelöstes Pellet von 5 Retinae pro Flasche). Nach 3-4 Tagen wurde das Medium gewechselt und kleinere, locker sitzende Gewebsreste vorsichtig mit Müllerzellmedium abgespült, ohne dabei die adhärennten Müllerzellkolonien abzulösen. Bis zum Erreichen der Konfluenz wurde der Zellrasen auf gleich Weise bei jedem Mediumwechsel gespült. Ab dem ersten Passagieren wurden die Müllerzellen nach den in Tabelle 11 aufgeführten Bedingungen in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (EasyFlasks Nunclon™) kultiviert. Falls nicht anders vermerkt, wurden 2.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Zur serumfreien Behandlung der Müllerzellen wurde das Medium ohne FBS eingesetzt.

**Tabelle 11: Auflistung von Herkunft und Kultivierbedingungen der Müllerzellen**

Zelllinie/Bezugsquelle	Zusammensetzung Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
Müllerzellen aus der Ratte (Primärzellen)/eigene Isolation	500 ml DMEM + GlutaMax™-II 50 ml FBS 5 ml Penicillin/Streptomycin 1 ml Gentamycin	37 °C/5 % CO <sub>2</sub>

### 3.2.3 Kultivierung von primären mikrovaskulären Endothelzellen

Primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) wurden nach den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstums-

fläche (EasyFlasks Nunclon™) kultiviert. Falls nicht anders vermerkt, wurden 10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Zur serumfreien Behandlung der HDMEC wurde das Medium ohne Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix eingesetzt.

**Tabelle 12: Auflistung von Herkunft und Kultivierungsbedingungen der HDMEC**

Zelllinie/Bezugsquelle	Zusammensetzung Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC, Primärzellen)/ PromoCell, Heidelberg	500 ml Endothelial Cell Basal Medium MV 27,2 ml Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix 5 ml Penicillin/Streptomycin	37 °C/5 % CO <sub>2</sub>

### 3.2.4 Kultivierung von EBNA-pSNOS-Zellen

EBNA-pSNOS Zellen wurden nach den in Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen in TripleFlask-Zellkulturflaschen kultiviert. Diese Zellen sind in der Lage, rekombinantes humanes Norrin (rhNorrin) in das Medium zu sekretieren. Dies wurde erreicht, indem immortalisierte HEK(humane embryonale Nierenzellen)-293-EBNA Zellen von Ohlmann *et al.* mit dem Expressionsvektor pSNOS transfiziert wurden (Ohlmann *et al.* 2010). Dieser Vektor enthält die cDNA des humanen Norrins, wobei die Sequenz des endogenen Signalpeptids durch die des Ig κ Signalpeptids ersetzt wurde. Dies dient der Erhöhung der Sekretion von rhNorrin in den extrazellulären Raum. Zudem wurde an das 3'-Ende der Norrin-cDNA die Sequenz für ein 6xHis- und ein c-myc-Epitop angefügt, wodurch eine Identifizierung des rhNorrin über den c-myc-Tag oder den His-Tag (vgl. Abb. 9) möglich ist. Das Gen EBNA1 („Epstein-Barr nuclear antigen 1“) der HEK-293-EBNA Zellen gewährleistet die extrachromosomale Replikation des Expressionsvektors pSNOS und die stabile Verteilung auf die Tochterzellen bei der Mitose.

Für die Ernte von rhNorrin, wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für 3 Tage in FBS-freiem EBNA-pSNOS-Medium kultiviert. Dieser rhNorrin-haltige Zellüberstand wurde sodann abgenommen und für die Norrin-Aufreinigung (vgl. 3.5.8) bei 4 °C gelagert. Bis zu einer erneuten Ernte wurden die EBNA-pSNOS Zellen für mindestens 4 Tage in FBS-haltigem Medium (vgl. Tabelle 13) gehalten.

**Tabelle 13: Auflistung von Herkunft und Kultivierungsbedingungen der EBNA-pSNOS**

Zelllinie/Bezugsquelle	Zusammensetzung Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
EBNA-pSNOS (immortalisierte HEK-293-EBNA Zellen transfiziert mit pSNOS)/ PD Dr. Andreas Ohlmann (Ohlmann et al. 2010)	500 ml DMEM + GlutaMaxII 25 ml FBS 3 ml Hygromycin B 2,5 ml G418 1 ml Gentamycin	37 °C/7 % CO <sub>2</sub>

### 3.2.5 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Casy Zellzählers (Roche/Innovatis, Bielefeld), nach dem Prinzip der elektrischen Puls-Flächen-Analyse, ermittelt. Hierbei wurden 50 µl Zellsuspension der auszusäenden Zellen in 10 ml Casyton pipettiert, gemischt und vermessen.

### 3.2.6 Behandlung von Zellen für RNA- und Proteinanalysen

Bei allen Zellbehandlungen (vgl. Tabelle 14) für eine anschließende Analyse der Zell-RNA bzw. des Gesamtproteins der Zellen oder des Proteins im Zellüberstand, wurden die Zellen zunächst auf Multidishes Nunclon™ 6-Well-Platten ausgesät.

**Tabelle 14: Übersicht über die Zellbehandlungen für RNA- und Proteinanalysen**

Zelltyp	Behandlung mit	Dauer	weiteres Vorgehen
HDMEC	LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM)	3 h	Protein-Extraktion (RIPA)
HDMEC	SB216763 (5 µM, 10 µM, 20 µM)	3 h	Protein-Extraktion (RIPA)
HDMEC	rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml)	2 h	Protein-Extraktion (RIPA)
HDMEC	rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml), DKK-1 (100 ng/ml), rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml) + DKK-1 (100 ng/ml)	24 h	RNA-Extraktion
HDMEC	rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml)	36 h	Dot Blot mit Zellüberstand
Müllerzellen	rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml), DKK-1 (100 ng/ml), rhNorrin (20 ng/ml, 40 ng/ml) + DKK-1 (100 ng/ml)	24 h	RNA-Extraktion

Behandelt wurden die Zellen, sobald sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte. Nach der Behandlung wurde der Zellüberstand für einen Dot Blot (vgl. 3.5.5) abgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert bzw. die Zellen vor der Protein- und RNA-Extraktion (vgl. 3.5.1.1 und 3.4.4) mit PBS gewaschen.

### **3.2.7 Bestimmung der Zellproliferationsrate**

Um die Wirkung unterschiedlicher Reagenzien auf die Zellproliferation zu analysieren wurde der BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric) eingesetzt. Hierbei wird BrdU (Bromdesoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut. Entsprechend ihrer Proliferationsrate enthalten die Zellen nach BrdU-Behandlung unterschiedliche Mengen an BrdU. Dieses BrdU wird bei dem verwendeten BrdU-ELISA mit Hilfe von Peroxidase-konjugierten mouse anti-BrdU Antikörpern detektiert. Durch Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin kann dann die Peroxidaseaktivität anhand einer Blaufärbung, die nach Abstoppen ins Gelbe umschlägt, registriert (Goka & Farthing 1987), vermessen und so die Proliferation quantifiziert werden. Hierfür wurde die optische Dichte mit dem Spektralphotometer Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT) bestimmt. Der BrdU-ELISA wurde nach Anleitung des BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric)-Kits (Roche, Mannheim) wie folgt durchgeführt:

#### BrdU-ELISA-Protokoll

- 4000 HDMEC in jedes Well einer 96-Well Tissue Culture Plate (Sarstedt, Nümbrecht) aussäen
- HDMEC 24 h in serumfreiem, BrdU-versetztem (BrdU-Markierlösung 1:1000) Medium mit zu testenden Reagenzien (vgl. Tabelle 15) behandeln
- nach 24 h Zellen pro Well mit 200 µl FixDenat-Lösung Zellen bei RT fixieren und DNA denaturieren
- FixDenat-Lösung entfernen und pro Well Zellen mit 100 µl Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung (enthält Peroxidase-konjugierte mouse anti-BrdU Antikörper) für 90 min bei RT behandeln
- 3x mit 200 µl Waschlösung pro Well spülen



- pro Well Zellen mit 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin) für 5-30 min bei RT behandeln
- pro Well 25 µl 1 M Schwefelsäure zum Abstoppen auf Substratlösung geben
- in ELISA-Reader optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) messen

**Tabelle 15: Übersicht der mittels BrdU-ELISA untersuchten Behandlungen**

Zelltyp	Behandlung
HDMEC	LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM)
HDMEC	LiCl (1 mM), Quercetin (10 µM), LiCl (1 mM) + Quercetin (10 µM)
HDMEC	SB216763 (5 µM, 10 µM, 20 µM)

### 3.2.8 Analyse der Zellviabilität

Die Wirkung von LiCl bzw. SB216763 auf die Zellviabilität wurde mit Hilfe des WST-1 Reagenzes im sogenannten WST-1 Assay untersucht. Das Tetrazoliumsalz WST-1 („Water soluble tetrazolium 1“; 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) erscheint in wässriger Lösung leicht rötlich. Ausschließlich von vitalen Zellen wird WST-1 durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in das dunkelrot gefärbte Formazan umgewandelt (Berridge *et al.* 1996). Die Stärke des Farbumschlags konnte daher zur Quantifizierung der Zellviabilität genutzt werden. Hierfür wurde die optische Dichte mit dem Spektralphotometer Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT) bestimmt. Der WST-1 Assay wurde nach Anleitung des WST-1-Reagenzes („Cell Proliferation Reagent WST-1“ von Roche, Mannheim) wie folgt durchgeführt:

#### Protokoll des WST-1 Assays

- 4000 HDMEC in jedes Well einer 96-Well Tissue Culture Plate (Sarstedt, Nümbrecht) aussäen
- HDMEC 72 h in 100 µl serumfreiem Medium (pro Well) mit zu testenden Reagenzien (vgl. Tabelle 16) behandeln
- nach 72 h pro well 10 µl WST-1-Reagenz zugeben und 30 min bei 37 °C einwirken lassen

- in ELISA-Reader optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) messen

**Tabelle 16: Übersicht der mit Hilfe des WST-1 Assays analysierten Behandlungen**

Zelltyp	Behandlung
HDMEC	LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM)
HDMEC	SB216763 (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M)

### 3.2.9 Untersuchung der Migration

Zur Analyse der Zellmigration von HDMEC unter dem Einfluss von LiCl wurde ein Wundheilungsassay, wie von Russell *et al.* beschrieben, durchgeführt (Russell *et al.* 2003). Dazu wurden die Zellen zunächst auf Multidishes Nunclon™ 6-Well-Platten ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für 6 h in serumfreiem Medium gehalten. Anschließend wurden in den konfluenten Zellrasen jedes Wells mit einer sterilen 200  $\mu$ l Pipettenspitze aus Plastik 5 Läsionen gesetzt und die losen Zellen durch den Wechsel des serumfreien Mediums entfernt. Die Zellen wurden sodann für 18 h mit 0,2 mM bzw. 1 mM LiCl inkubiert. Zusätzlich war die Zellteilung während der Behandlung durch Gabe des Zytostatikums Mitomycin C unterbunden. Für die Quantifizierung der HDMEC-Migration wurden die Läsionen zu Beginn und am Ende der Behandlung mikroskopisch in 100x Vergrößerung dokumentiert (vgl. 3.7). Mit Hilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) wurde anhand der Aufnahmen die Migrationsfläche, also die Fläche der Läsion nach 0 h abzüglich der Läsionsfläche nach 18 h, bestimmt und auf die Länge der jeweiligen Läsion bezogen.

### 3.2.10 Immunzytochemische Färbung

Um den Ort der LiCl bzw. SB216763 induzierten  $\beta$ -Catenin-Akkumulation zu lokalisieren, wurden HDMEC zunächst auf BD Falcon Cultureslides (Zellkulturobjektträgern) ausgesät und bei ungefähr 70 % Konfluenz für 3 h mit 1 mM LiCl bzw. 10  $\mu$ M SB216763 behandelt. Die Zellen wurden sodann für 5 min mit Methanol fixiert und anschließend 3x 10 min mit 0,1 M PhP gewaschen. Daraufhin wurde  $\beta$ -Catenin

mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung markiert. Hierzu wurden spezifische, gegen das gesuchte Antigen gerichtete Primärantikörper verwendet. Diese waren nicht direkt mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt, sondern wurden durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Hierbei kamen Sekundärantikörper zum Einsatz, welche ein Epitop der Primärantikörper erkennen und mit Hilfe einer Biotinylierung ihrerseits Alexa 488-konjugiertes Streptavidin binden. Über die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs (Alexa 488) mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm, konnte  $\beta$ -Catenin indirekt lokalisiert werden. Im Vorfeld der Antikörperinkubation wurden die Zellen auf den Objektträgern blockiert, wodurch eine potentielle, unspezifische Bindung der Antikörper minimiert wurde. Die Blockierung und die Antikörperinkubation erfolgten wie in Tabelle 17 vermerkt.

**Tabelle 17: Protokoll für die Fixierung, Blockierung und Antikörperinkubation**

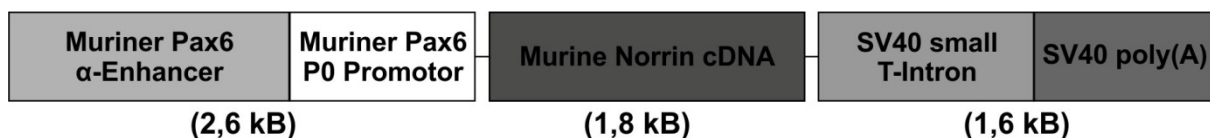
Fixierung/Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper/Tertiärantikörper
Methanol, 5 min, RT/ 3 % BSA und 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rabbit-anti- $\beta$ -Catenin 1:100 in 1:10 verdünnter Blockierung, ÜN, 4 °C	Biotin-konjugierte goat-anti-rabbit 1:500 in 1:10 verdünnter Blockierung, 1 h, RT/ Alexa Fluor® 488-konjugiertes Streptavidin 1:1000 in 1:10 verdünnter Blockierung, 1 h, RT

Um die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper zu untersuchen, wurden bei Kontrollzellen (Negativkontrollen) die Primärantikörper durch die 1:10 verdünnte Blockierung ersetzt. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern (bzw. 1:10 verdünnter Blockierung), den Biotin-konjugierten Antikörpern und dem Streptavidin wurden die HDMEC jeweils 3x 5 min mit 0,1 M PhP gespült. Sodann wurden die gefärbten Zellen mit einem DAPI-haltigen Mounting Medium eingedeckelt. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der mit Licht einer Wellenlänge von 381 nm angeregt wird, diente der direkten Lokalisation der DNA und somit der HDMEC-Zellkerne. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.7) wurden die immunzytochemisch gefärbten Zellen bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.3 *In vivo* Versuche

#### 3.3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Durchführung der Versuche wurden sowohl Mäuse als auch Ratten benötigt. Wistar Ratten, die Maus-Inzuchtstämme DBA/2J und FVB/N sowie der Maus-Auszuchtstamm CD-1 wurden hierfür von Charles River aus Sulzfeld bezogen. Transgene  $\beta$ B1-Norrin Mäuse im FVB/N Hintergrund, welche eine ektope Überexpression von Norrin in der Linse unter der Kontrolle des  $\beta$ B1-Crystallin-Promotors besitzen (Ohlmann *et al.* 2005), wurden von PD Dr. Andreas Ohlmann zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden von PD Dr. Ohlmann auch die Linien 04, 06 und 69 der transgenen Pax6-Norrin Mäuse (im FVB/N Hintergrund) generiert, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Die Pax6-Norrin Mäuse tragen ein Konstrukt, bei dem murine Norrin cDNA unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancerelements des murinen Pax6 Promotors steht und die SV40 poly(A) Sequenz, einschließlich des SV40 small T-Intron, das Polyadenylierungssignal liefert (vgl. Abb. 7). Das verwendete Promotorkonstrukt vermittelt eine nahezu spezifische Expression in Neuronen der inneren Retina (Marquardt *et al.* 2001).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des transgenen Konstrukts der Pax6-Norrin Mäuse.**

Die Haltung und Behandlung aller Versuchstiere erfolgte in Übereinstimmung mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“. Zudem lagen für alle Tierversuche dieser Arbeit genehmigte Tierversuchsanträge vor. Die Mäuse und Ratten wurden im Tierlabor der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg bei einer Temperatur von  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ,  $55\% \pm 5\%$  Luftfeuchtigkeit, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden und mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

Zur Zucht der transgenen Mauslinien wurde jeweils eine transgene Maus mit einem wildtypischen Tier des gleichen genetischen Hintergrunds verpaart. Im Zuge der Ge-

notypisierung (vgl. 3.3.2.2 und 3.4.2) der Nachkommen wurden die Mäuse mit Ohrmarken versehen.

Für die Charakterisierung adulter Pax6-Norrin Mäuse und ihrer Analyse im NMDA-Modell, wurden transgene Tiere im genetischen FVB/N Hintergrund mit CD-1 Wildtypmäusen verpaart, um die autosomal rezessive retinale Degeneration (rd1), welche sich im homozygoten FVB/N Hintergrund entwickelt (Giménez & Montoliu 2001), zu vermeiden. Die daraus resultierende F1-Generation wurde sodann für die genannten Untersuchungen verwendet.

### **3.3.2 Gewebepräparationen**

#### **3.3.2.1 Perfusion von Mäusen**

Zum Zweck der Gewebefixierung bzw. der Darstellung retinaler Gefäße wurden Mäuse perfundiert. Die Mäuse wurden dazu zunächst mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) tief anästhesiert. Sodann wurde die *Cavitas abdominalis* eröffnet, das *Diaphragma* vom Rippenbogen gelöst und der *Thorax* lateral auf beiden Seiten aufgeschnitten. Anschließend wurde das Herz in der Brusthöhle freigelegt, die Kanüle des Ecoflo Perfusionsbestecks (Dispomed Witt oHG, Geinhausen) in den *Apex cordis* des linken Ventrikels eingeführt und das rechte Atrium geöffnet. Über das Perfusionsbesteck wurde daraufhin heparinisiertes PBS (1 ml Heparin-Natrium auf 1 l PBS) bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran (hochmolekular, 50 mg/ml, gelöst in PBS; dient der Darstellung von Gefäßen) mit Hilfe des schlagenden Herzens im Blutgefäßsystem verteilt und das Blut solange aus dem Kreislauf entfernt, bis eine Hellfärbung der Leber erkennbar war. Bei den PBS-perfundierten Mäusen wurde im Anschluss daran noch mit EM-Fixans oder 4 % PFA weiterperfundiert. Sobald das Mausgewebe sichtbar fixiert war, wurde die Perfusion beendet. Nach der Perfusion wurden aus allen Mäusen die Augen und oder die Sehnerven entnommen (vgl. 3.3.2.2). Eine Auflistung der verschiedenen Perfusionen findet sich in Tabelle 18.

**Tabelle 18: Liste der durchgeführten Perfusionen**

verwendete Mäuse	Perfusionszeitpunkt	Perfusionslösung	Zweck der Perfusion
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1	P42	PBS (heparinisiert) und EM-Fixans	Gewebefixierung
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1	P22	PBS (heparinisiert) und 4% PFA	Gewebefixierung
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1	P57, 3 Wochen nach NMDA-Injektion	PBS (heparinisiert) und EM-Fixans	Gewebefixierung
FVB/N	P14 nach OIR und intravitrealer Injektion von Antikörpern gegen IGF-1	FITC-Dextran	Darstellung retinaler Gefäße
FVB/N	P13 nach OIR und intravitrealer LiCl-Injektion	FITC-Dextran	Darstellung retinaler Gefäße
FVB/N	P14 nach OIR und intraperitonealen LiCl-Injektionen	FITC-Dextran	Darstellung retinaler Gefäße
FVB/N	P12, 6 h nach intravitrealer LiCl-Injektion und OIR	PBS (heparinisiert) und 4% PFA	Gewebefixierung
Pax6-Norrin 04/DBA/2J bzw. DBA/2J	P56	PBS (heparinisiert) und EM-Fixans	Gewebefixierung
Pax6-Norrin 04/DBA/2J bzw. DBA/2J	im Alter von einem Jahr	PBS (heparinisiert) und EM-Fixans	Gewebefixierung

### 3.3.2.2 Entnahme von Augen, Sehnerven und Schwanzbiopsien

Aus perfundierten Mäusen bzw. aus durch Dekapitation (Ratten bis P12 bzw. Mäuse bis P14) oder Zervikale Dislokation (adulte Mäuse) getöteten Tieren wurden Augen und die daran verankerten Sehnerven mit Hilfe einer stumpfen, gebogenen Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) entnommen. Bei Tieren bis P14 mussten zuvor die geschlossenen Augenlider geöffnet werden. Tabelle 19 enthält eine Übersicht aller Entnahmen von Augen und Sehnerven sowie deren weitere Verwendung.

**Tabelle 19: Übersicht der Entnahme von Augen und Sehnerven**

Entnahme aus	Entnahmezeitpunkt	Entnahme von	weitere Verwendung
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1	nach Perfusion	Augen und Sehnerven	Eponeinbettung
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1	P22	Augen	Protein-Extraktion (RIPA) aus Retina
FVB/N	P12, 6 h nach intravitrealer bzw. intraperitonealer Injektion mit LiCl und OIR	Augen	Protein-Extraktion (RIPA) aus Retina
FVB/N Normoxie	P7, P9, P12, P13	Augen	RNA-Extraktion aus Retina
Mäuse des NMDA- Schadensmodells	nach Perfusion	Sehnerven	Eponeinbettung
mit 4 % PFA perfundierte Mäuse	nach Perfusion	Augen	Kryoeinbettung
mit FITC-Dextran perfundierte Mäuse	nach Perfusion	Augen	Herstellung retinaler Häutchenpräparate
Pax6-Norrin 04/ DBA/2J bzw. DBA/2J	nach Perfusion	Augen und Sehnerven	Eponeinbettung
Pax6-Norrin/ FVB/N bzw. FVB/N	P2	Augen	RNA-Extraktion aus Retina
Ratten	P8-P12	Augen	Isolation von Müllerzellen
$\beta$ B1-Norrin/FVB/N bzw. FVB/N des OIR-Modells	P7, P9, P12	Augen	RNA-Extraktion aus Retina
$\beta$ B1-Norrin/FVB/N bzw. FVB/N des OIR-Modells	P13	Augen	RNA- und Protein- Extraktion (TriFast) aus Retina

Für die Genotypisierung (vgl. 3.4.2) wurden Mäuse transgener Mauslinien durch Inhalation von Isofluran kurzzeitig narkotisiert und mit einer Schere (Fine Science Tools, Heidelberg) 0,5 cm lange Mausschwanzbiopsien für die anschließende DNA-Extraktion (vgl. 3.4.1) gewonnen.

### 3.3.2.3 Retinapräparation

Für die Extraktion von retinaler RNA (vgl. 3.4.4) bzw. von retinalem Gesamtprotein (vgl. 3.5.1) wurden die Retinae der enukleierten Augen (vgl. 3.3.2.2) präpariert. Hierzu wurde mit einer Federschere (Fine Science Tools, Heidelberg) zirkulär entlang der *Ora serrata* geschnitten und das vordere Augensegment entfernt. Aus dem Augenbecher wurde die Linse mit Hilfe einer feinen Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg) herausgenommen. Um die Retina vom retinalen Pigmentepithel abtrennen zu können, wurde der Augenbecher an der 3 Uhr-, 6 Uhr-, 9 Uhr- und 12 Uhr-Position radiär eingekerbt und plan entfaltet. Die so freipräparierten Retinae von wildtypischen bzw. transgenen P2 Mäusen eines ganzen Wurfs wurden für die weitere Verwendung gepoolt. Hingegen wurden die beiden Retinae aus den Augen eines intravitreal injizierten Tieres generell getrennt weiterverarbeitet. In allen anderen Fällen wurden die beiden Retinae eines Tieres gepoolt weiterverwendet.

### 3.3.2.4 Herstellung von retinalen Häutchenpräparaten

Um die Rekapillarisation vasoobliterierter Netzhautareale und die Formation intraretinaler Gefäße nach OIR auswerten zu können, wurden retinale Häutchenpräparate hergestellt. Dies erfolgte in Anlehnung an eine von Connor *et al.* publizierte Methode (Connor *et al.* 2009). Mit FITC-Dextran perfundierte Augen (vgl. 3.3.2.1 und 3.3.2.2) wurden zunächst für 2 h mit 4 % PFA immersionsfixiert und anschließend 3x für 10 min mit 0,1 M Phosphatpuffer (PhP) gewaschen. Die Augen wurden sodann mit Hilfe eines Stereomikroskops (vgl. 3.7) in einer Petrischale, gefüllt mit 0,1 M PhP, präpariert. Hierfür wurde zunächst in die Cornea mit einer Federschere (Fine Science Tools, Heidelberg) ein radialer Schnitt gesetzt, durch den diese in zwei gleich große Hälften geteilt wurde. Die beiden Cornea-Hälften dienten als Ansatzstellen für 2 Pinzetten (Fine Science Tools, Heidelberg), mit deren Hilfe die Sklera in Richtung des *Nervus opticus* abgeschält wurde. Hierdurch wurde die Retina mit der Linse freigelegt. Als Nächstes wurde die Linse entfernt und die Retina in einen Tropfen 0,1 M PhP, der sich auf einem Objektträger befand, transferiert. Im Anschluss daran wurde die Retina an der 3 Uhr-, 6 Uhr-, 9 Uhr- und 12 Uhr-Position radiär eingeschnitten. Daraufhin wurde der 0,1 M Phosphatpuffer mit einer Pipette abgesaugt, wodurch sich das Retinahäutchen auf dem Objektträger ausbreitete. Zum Schluss wurde das Häut-



chenpräparat mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung (vgl. 3.3.7.2) wurden die Häutchenpräparate bei 4 °C gelagert.

### 3.3.3 Intraperitoneale und intravitreale Injektionen

Durch intraperitoneale Injektionen wurden Mäuse im Vorfeld der Augeninnendruckmessung (vgl. 3.3.5.1) und der Perfusion (vgl. 3.3.2.1) mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) tief anästhesiert. Des Weiteren wurden FVB/N Mäuse an P12 nach OIR mit LiCl (50 µg/g Körpergewicht; gelöst in PBS) bzw. PBS intraperitoneal injiziert, um die LiCl-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zu analysieren. Für die Untersuchung des Einflusses von LiCl auf die Rekapillarisation vasoobliterierter Areale wurde FVB-N Mäusen nach OIR, zwischen P12 und P14 alle 12 Stunden (insgesamt 3x), LiCl (50 µg/g Körpergewicht; gelöst in PBS) bzw. PBS intraperitoneal verabreicht.

**Tabelle 20: Liste der intravitrealen Injektionen**

verwendete Mäuse	Injektionszeitpunkt	injizierte Substanzen
βB1-Norrin/FVB/N bzw. FVB/N	P12 nach OIR	rechtes Auge: 3 µl PBS linkes Auge: 3 µl Antikörper gegen IGF-1 (0,2 µg/µl)
FVB/N	P12 nach OIR	rechtes Auge: 1 µl PBS linkes Auge: 1 µl LiCl (10 µg/µl, gelöst in PBS)
F1-Generation aus Verpaarung Pax6-Norrin 04/ FVB-N mit CD-1	P36	rechtes Auge: 3 µl PBS linkes Auge: 3 µl NMDA (10 mM, gelöst in PBS)

Vor der Durchführung intravitrealer Injektionen wurden Mäuse durch Inhalation von Isofluran narkotisiert. Die zu injizierende Substanz wurde mit Hilfe einer 25 µl Hamiltonspritze (Roth, Karlsruhe) und einer daran gekoppelten, abgeschrägten 35 Gauge Injektionskanüle (W. P. I., Berlin) intravitreal appliziert. Dafür wurde die Kanüle am Äquator des Auges durch die Sklera, vorbei an der Linse, in den *Corpus vitreum* gestochen. Nach dem Einspritzen der gewünschten Substanz blieb die Kanüle noch für 20 s im Glaskörper, wodurch eine Anpassung des Auges an die Volumenveränderung ermöglicht und ein Wiederaustritt der injizierten Substanz

vermieden wurde. Daraufhin wurde die Injektionskanüle langsam aus dem Auge herausgezogen. Tabelle 20 zeigt eine Übersicht mit Details aller intravitrealer Injektionen der vorliegenden Arbeit. Die Injektionen in das rechte Auge dienten jeweils als Kontrolle.

### 3.3.4 Das NMDA-Schadensmodell

Die Wirkung der Norrin-Überexpression in den Pax6-Norrin Mäusen bei einer akuten exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen wurde am NMDA-Schadensmodell (vgl. 1.3.1) untersucht. Bei diesem Modell kommt es durch eine intravitreale NMDA-Injektion zur Aktivierung von NMDA-Rezeptor-Kanälen, einem daraus resultierenden anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und schließlich zur Apoptose retinaler Ganglienzellen (Shen *et al.* 2006). NMDA-Rezeptoren finden sich in den Ganglien- und den Amakrinzellen der Retina (Slaughter 2010).

In Anlehnung an das von Siliprandi *et al.* beschriebene Vorgehen (Siliprandi *et al.* 1992), wurde transgenen und wildtypischen, adulten Mäusen der F1-Generation aus der Verpaarung einer Pax6-Norrin 04/FVB/N Maus mit einem CD-1 Wildtypen, PBS bzw. das Glutamat analogon NMDA intravitreal injiziert (vgl. 3.3.3). Drei Wochen nach Injektion wurden die Sehnerven perfundiert (vgl. 3.3.2.1), entnommen (vgl. 3.3.2.2) und analysiert (vgl. 3.3.6).

### 3.3.5 Das DBA/2J-Mausmodell

DBA/2J Mäuse entwickeln im Lauf ihres Lebens ein, mit dem Anstieg ihres Augeninnendruck verbundenes, Sekundärglaukom und sind ein gutes Modell, um einen chronisch progredienten Verlust retinaler Ganglienzellen zu analysieren (vgl. 1.3.1). Für die Testung des Einflusses der transgenen Norrin-Expression, unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancerelements des murinen Pax6 Promotors, auf eine chronische Degeneration von retinalen Ganglienzellen, wurden die Pax6-Norrin 04 Mäuse daher aus dem genetischen FVB/N Hintergrund in den DBA/2J Hintergrund überführt. Dazu wurden Pax6-Norrin Mäuse 7x mit DBA/2J Wildtypmäusen rückgekreuzt.

### 3.3.5.1 Messung des intraokularen Drucks

Der intraokulare Druck der Mäuse im DBA/2J Hintergrund wurde nach 2, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten mit Hilfe des TonoLab Tonometers (Tioloat Oy, Helsinki, FIN) gemessen. Bei dieser nicht-invasiven, applanationstonometrischen Messung nach Goldmann (Moses 1958) wird der Augeninnendruck über die Kraft des Gegendrucks gegen eine Applanation der Cornea durch die Tonometer-Sonde bestimmt. Der mit dem TonoLab Tonometer ermittelte Druck entspricht dem Mittelwert aus 6 Einzelmessungen. Vor der Messung des intraokularen Drucks wurden die Mäuse mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (8 mg/kg Körpergewicht) tief anästhesiert. Um eine Verfälschung der Werte durch die circadiane Rhythmik des Augeninnendrucks (Sugimoto *et al.* 2006) zu vermeiden, wurde stets zwischen 14 und 16 Uhr gemessen. Von jedem Auge wurde der Augeninnendruck 6x mit dem Tonometer bestimmt und daraus ein Mittelwert berechnet.

### 3.3.5.2 Bewertungskriterien für den vorderen Augenabschnitt

**Tabelle 21: Bewertungskriterien für Veränderungen der Augenvorderkammer**

Art der Veränderung	Schweregrad	Merkmale
vordere Synechie	mild	Synechie bedeckt nur einen Teil des Trabekelwerks
	moderat	Kammerwinkel ist verlegt
	stark	Kammerwinkel verschlossen; Anheftung der Iris an die Cornea auf breiter Fläche
Pigmentepithel-atrophie der Iris	mild	Stroma hat normale Dicke; Pigmentepithelschicht hat weniger Zellen als normal
	moderat	Stroma ist deutlich schmaler; Pigmentepithelschicht ist einschichtig und abgeflacht
	stark	Stroma und das zweischichtige Pigmentepithel stark ausgedünnt; Iris wirkt fadenförmig
Atrophie des Ziliarkörpers	mild	Ziliarfortsätze sind verkürzt; zweischichtiges Epithel erscheint normal
	moderat	atrophiierte Ziliarfortsätze mit schwächer ausgeprägtem, zweischichtigem Epithel
	stark	stark atrophiierte Ziliarfortsätze mit atrophiierten Epithellagen

Für die Phänotypanalyse der Pax6-Norrin Mäuse (6 Wochen nach der Geburt) und die Analyse des DBA/2J Mausmodells (2 Monate und 1 Jahr alte Tiere) wurde der

vordere Augenabschnitt in sagittalen Semidünnschnitten der Augen, nach Richardson-Färbung (vgl. 3.6.2.2), in 100x Vergrößerung lichtmikroskopisch (vgl. 3.7) untersucht. Hierbei lag der Fokus auf der Ausbildung einer vorderen Synechie, einer Pigmentepithelatrophy der Iris und einer Atrophie des Ziliarkörpers. Beim Vorliegen dieser Veränderungen wurden die Sehnerven, nach von John *et al.* publizierten Kriterien (John *et al.* 1998), hinsichtlich des Schweregrades in verschiedene Klassen eingeteilt (vgl. Tabelle 21). Mit Hilfe dieser semiquantitativen Analyse konnte die Häufigkeit des Schweregrades der jeweiligen Veränderung bestimmt werden. Repräsentative Bilder des vorderen Augenabschnitts wurden in 400x Vergrößerung am Lichtmikroskop (vgl. 3.7) aufgenommen.

### 3.3.5.3 Evaluation der Sehnervenschädigung

Die Schädigung der Sehnerven von ein Jahr alten Mäusen im DBA/2J Hintergrund wurde an mit Phenylendiamin (vgl. 3.6.2.1) kontrastierten, sagittalen Semidünnschnitten der *Nervi optici* untersucht. Dabei wurden die Schnitte in 1000x Vergrößerung am Lichtmikroskop (vgl. 3.7) aufgenommen und, hinsichtlich des Grades ihrer Schädigung, nach gängigen Kriterien in drei Klassen eingeteilt (Anderson *et al.* 2005; Libby *et al.* 2005c). Mit Hilfe dieser in Tabelle 22 dargestellten Kriterien konnte die Häufigkeit der 3 Schadensniveaus semiquantitativ abgeschätzt werden.

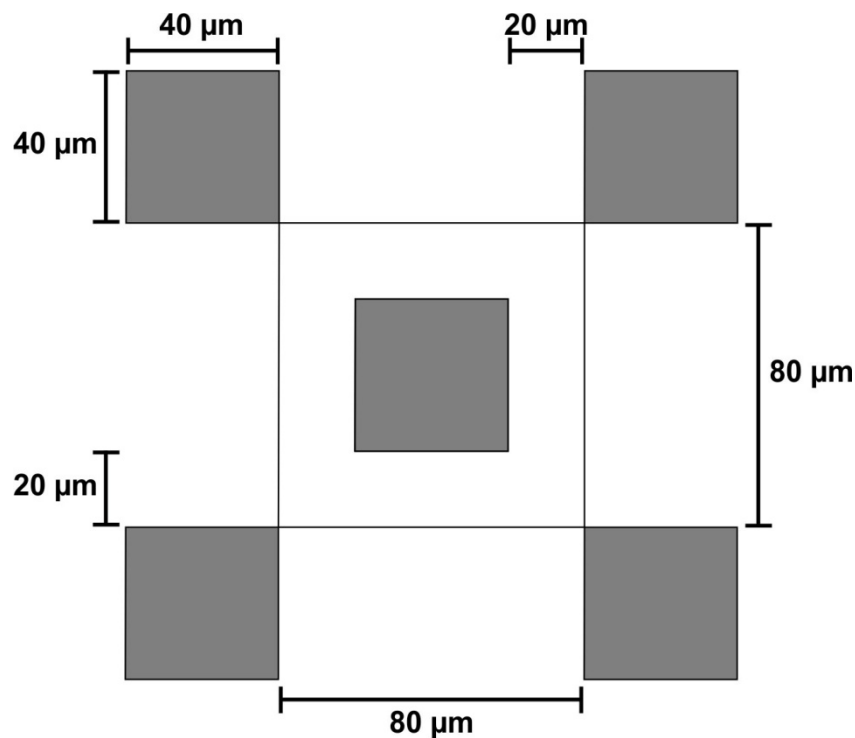
**Tabelle 22: Kriterien zur Bewertung der Sehnervenschädigung**

Schweregrad der Sehnervenschädigung	Merkmale
mild	keine oder wenig geschädigte Axone
moderat	geringere Axonzahl, vermehrt geschädigte Axone und gliale Vernarbung
stark	massiver Axonverlust und großflächige gliale Narben

### 3.3.6 Quantifizierung der RGC-Axonzahl

Zur Phänotypanalyse der Pax6-Norrin Mäuse (6 Wochen nach der Geburt), der Auswertung des NMDA-Schadens- und des DBA/2J-Mausmodells wurde die Anzahl der Axone retinaler Ganglienzellen (RGC) in den Sehnerven quantifiziert. Hierzu wurden die, mit Phenylendiamin (vgl. 3.6.2.1) kontrastierten, sagittalen Semidünnschnitten

schnitte der *Nervi optici* zunächst in 1000x Vergrößerung am Lichtmikroskop (vgl. 3.7) aufgenommen. Zur Analyse des NMDA-Schadensmodells wurden alle Axone eines Sehnervs mit Hilfe des Zählungswerkzeugs des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe, San Jose, USA) ausgezählt. Für die Quantifizierung der Axonzahl in den Sehnerven der übrigen Analysen, kam eine Abwandlung einer von Anderson *et al.* publizierten Zählmethode zum Einsatz (Anderson *et al.* 2005). Dabei wurde die Axonzahl in 5 repräsentativen Quadraten eines am Computer eingeblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) ermittelt und auf die gesamte Fläche des jeweiligen Sehnervs hochgerechnet. Durch das verwendete Raster wurden zentrale und periphere Bereiche der *Nn. optici* in die Quantifizierung miteinbezogen und so dem ungleichmäßig verteilten RGC-Verlust in DBA/2J Mäusen (Jakobs *et al.* 2005) Rechnung getragen. Für die Zählung der Axone wurde wieder das Zählungswerkzeug des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe, San Jose, USA) verwendet. Die Fläche der Sehnerven wurde mit der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) bestimmt.



**Abb. 8: Raster für die Bestimmung der Axonzahl des Nervus opticus.**

Das dargestellte Raster wurde digital in Panoramaaufnahmen von Semidünnschnitten der *Nervi optici* eingeblendet und mittig ausgerichtet. Innerhalb der fünf grau hervorgehobenen Quadrate wurden anschließend die Axone gezählt.

### **3.3.7 Das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie**

Die Sauerstoff-induzierte Retinopathie (OIR; vgl. 1.2.4) ist ein Mausmodell für die *Retinopathia praematurorum* (ROP) des Menschen und dazu geeignet, Mechanismen der retinalen Gefäßentwicklung zu analysieren (Stahl *et al.* 2010).

#### **3.3.7.1 Experimentelle Durchführung**

Wie von Connor *et al.* beschrieben, wurden die im Zusammenhang mit LiCl und IGF-1 zu untersuchenden Mäuse (FVB/N bzw.  $\beta$ B1-Norrin/FVB/N) zwischen P7 und P12 zusammen mit Ihrer Müttern in einer Hyperoxie-Kammer gehalten. In dieser aus Plexiglas gefertigten Kammer herrschte über den gesamten Zeitraum ein Sauerstoffgehalt von 75 %. Hierzu wurde ein Luftgemisch mit entsprechendem Sauerstoffgehalt aus Sauerstoff und Stickstoff gemischt und kontinuierlich über einen Schlauch in die Kammer geleitet. Die Hyperoxie-Kammer verfügte zusätzlich über einen Auslass mit einem Schlauch gleichen Durchmessers, welcher in ein Becherglas mit Wasser mündete. Auf diese Weise konnte anhand der Blasenbildung im Wasser des Glases die Gaszufuhr und die Dichtigkeit der Kammer überprüft werden. Die Mischung von Sauerstoff und Stickstoff erfolgte in einer Mischkammer, die über zwischengeschaltete Druckminderer (KAYSER GmbH, Plaidt/Koblenz) mit entsprechenden Gasflaschen verbunden war und in der der Sauerstoffgehalt mit Hilfe der Sauerstoffelektrode GGO 369 MU (GREISINGER electronic GmbH, Regensburg) gemessen wurde. Zur Sauerstoffregelung kam der Messumformer für Luft-sauerstoff OXY 3690 (GREISINGER electronic GmbH, Regensburg) zum Einsatz. Bei Entnahme von einzelnen Tieren während der Hyperoxie-Exposition (an P9), wurde die Zufuhr des Luftgemisches kurzfristig erhöht, um das Absinken des Sauerstoffgehalts durch die Öffnung der Kammer zu kompensieren. Alle anderen Mäuse wurden zusammen mit ihren Müttern an P12 wieder zurück an die Raumluft gebracht.

#### **3.3.7.2 Quantifizierung der retinalen Gefäßveränderungen**

Der Einfluss von LiCl bzw. inhibitorischen Antikörpern gegen IGF-1 auf die Rekapillarisation vasoobliterierter Netzhautareale (an P13 bzw. P14) und die Bildung der in-

traretinalen Gefäße (an P14) wurde an FITC-Dextran-perfundierten retinalen Häutchenpräparaten von Mäusen mit OIR analysiert. Hierfür wurde, wie von Ohlmann *et al.* beschrieben, vorgegangen (Ohlmann *et al.* 2010). Der oberflächliche retinale Plexus mit den vasoobliterierten Arealen wurde in 50x Vergrößerung und die intraretinalen Gefäße in 200x Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch (vgl. 3.7) dokumentiert. Mit Hilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) wurden die gesamte Fläche des oberflächlichen Plexus, die vasoobliterierte Fläche und die Fläche der intraretinalen Kapillaren gemessen und der prozentuale Anteil der vasoobliterierten Fläche (an P13 oder P14) bzw. der Fläche der intraretinalen Kapillaren (an P14) an der gesamten Fläche des oberflächlichen Plexus der Retina bestimmt. Für repräsentative Aufnahmen wurde das vasoobliterierte Areal mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe, San Jose, USA) farblich hervorgehoben.

### **3.3.8 Dickenmessung von Retina, INL und ONL**

Im Zuge der Phänotypanalyse der Pax6-Norrin Mäuse wurden die Gesamtdicke der Retina sowie die Dicke der inneren und äußeren Körnerschicht (INL und ONL) bestimmt. Dafür wurden sagittale Semidünnschnitte der Retinae von 6 Wochen alten Mäusen, nach Richardson-Färbung (vgl. 3.6.2.2), in 630x Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (vgl. 3.7) aufgenommen. Anschließend wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Fiji, das auf ImageJ (NIH, Bethesda, USA) basiert, beide Zirkumferenzen der Retina, von der *Ora serrata* (OS) bis zum Sehnervenkopf (ONH) sowie vom ONH zur OS, jeweils in zehn gleiche Abschnitte aufgeteilt und die Dicke (von Retina, INL und ONL) am Anfang sowie am Ende jedes Zehntels gemessen. Von den jeweiligen Dicken der entsprechenden Abschnitte beider Zirkumferenzen einer Retina wurde dann ein Mittelwert berechnet.

## 3.4 Molekularbiologische Techniken

### 3.4.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien

Für die Genotypisierung (vgl. 3.4.2) transgener Mauslinien wurde die DNA aus Mausschwanzbiopsien (vgl. 3.3.2.2) extrahiert. Dazu wurden die Gewebestücke in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in je 200 µl Mausschwanz-Lysepuffer (vgl. 3.1.5) üN bei 900 UpM und 55 °C im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) lysiert. Daraufhin wurden die Proben 10 min bei 95 °C inkubiert, um die im Puffer enthaltene Proteinase K zu inaktivieren. Anschließend wurde für 10 min bei 13200 UpM zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA diente dann als DNA-Matrize (Template) für die Genotypisierungs-PCR (vgl. 3.4.2).

### 3.4.2 Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierungs-PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen) für die Pax6-Norrin und die βB1-Norrin Mäuse wurden mit Primern (vgl. 3.1.3), welche einen 300 bp langen DNA-Abschnitt beider transgenen Konstrukte, vom SV40 small-T Intron zum SV40 poly(A), abdecken (Ohlmann *et al.* 2010), durchgeführt. Für die PCR wurde der in Tabelle 23 aufgelistete Reaktionsansatz eingesetzt. Die Amplifikation des transgenen DNA-Abschnitts erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) nach dem Programm von Tabelle 24. Anschließend wurden die entstandenen Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.4.3) aufgetrennt.

**Tabelle 23: 25 µl Reaktionsansatz (1x) für SV40-PCR**

Komponenten	Volumen
H <sub>2</sub> O	16,8 µl
10x Puffer (Bioline)	2,5 µl
DNA aus Mausschwanz	2,0 µl
Magnesiumchlorid (50 mM; Bioline)	2,0 µl
dNTPs (Bioline)	0,5 µl
SV40-Primer forward	0,5 µl
SV40-Primer reverse	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (Bioline)	0,2 µl



**Tabelle 24: Thermocyclerprogramm für SV40-PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer
1: Initiation	94 °C	2 min
2: Denaturierung	94 °C	30 s
3: Annealing	55 °C	30 s
4: Elongation	72 °C	45 s
Schritt 2-4: 36x		
5: End-Elongation	72 °C	5 min
6: Halten	12 °C	∞

### 3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die linearen PCR-Produkte (vgl. 3.4.2) in einem Agarosegel mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden die Zutaten (vgl. 3.1.5) aufgekocht, auf ungefähr 50 °C abgekühlt, in einen Gelschlitten gegossen und mit einem Plastikamm versehen. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde der Kamm entfernt, das Gel in der Elektrophoresekammer Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit 1x TBE (vgl. 3.1.5) vollständig bedeckt und jeweils 10 µl der Proben (Genotypisierungs-PCR-Amplifikate) mit 1x Auftragspuffer (vgl. 3.1.5) in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard wurden zusätzlich 4 µl der GeneRuler 100bp DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 125 V für 40 min. Durch die Interkalation des im Agarosegel enthaltenen Ethidiumbromids in die DNA konnten die Banden der transgenen Proben anschließend mittels kurzwelliges UV-Lichts am Transilluminator (Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch) sichtbar gemacht, ihre Länge bestimmt und mit einer Kamera dokumentiert werden.

### 3.4.4 RNA-Extraktion

Um RNA aus murinen Retinae (vgl. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) bzw. aus behandelten Zellen (vgl. 3.2.6) mit der einphasigen TriFast<sup>TM</sup>-Lösung (basierend auf Phenol und Guanidinisothiocyanat) zu extrahieren, wurde die von Chomczynski publizierte Methode verwendet (Chomczynski 1993), bei welcher durch Zugabe von Chloroform durch Phasentrennung RNA, DNA und Proteine isoliert werden können. Die RNA-Ex-

traktion wurde nach der Anleitung von peqGOLD TriFast™ (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wie folgt durchgeführt:

### Protokoll der RNA-Extraktion mit TriFast™

- 50-100 mg Gewebe mit 1 ml TriFast™ homogenisieren bzw. Zellen in Zellkulturschale (10 cm<sup>2</sup>) mit 1 ml TriFast™ durch Auf-und Abpipettieren lösen
- 5 min bei RT in Reaktionsgefäß inkubieren
- je 1 ml TriFast™ 200 µl Chloroform zugeben und 15 s vortexen
- 3-10 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 12000 x g zentrifugieren
- wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen (Interphase und organische Phenol-Chloroform-Phase für Proteinextraktion (vgl. 3.5.1.2) bei 4 °C lagern)
- je 1 ml TriFast™ 0,5 ml Isopropanol zugeben und vortexen
- 15 min bei 4 °C inkubieren
- 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet (RNA-Präzipitat) 2x mit 1 ml 75 % Ethanol durch Vortexen und Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C waschen
- Überstand vollständig abnehmen, Pellet kurz trocknen lassen
- Pellet in 15 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O lösen
- RNA bei -20 °C bzw. -80 °C lagern

### **3.4.5 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDROP 2000c (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) zur optischen Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) diente bei den Messungen als Indikator der RNA-Reinheit. Dieser Quotient lag bei den für die Analysen verwendeten RNA-Proben zwischen 1,6 und 2,0.

### 3.4.6 Northern Blot

Die mRNA-Expression des transgenen Norrins in den Retinae der Pax6-Norrin Mäuse wurde mit Hilfe der Northern Blot Analyse untersucht. Hierbei wurde die extrahierte Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Auf dieser Membran konnte die mRNA des transgenen Norrins mit Hilfe spezifischer Sonden detektiert werden, wodurch eine Aussage über das Vorhandensein und die relative Menge der transgenen Norrin-mRNA getroffen werden konnte.

Bei den Sonden konnte auf die von Ohlmann *et al.* generierten antisense-RNA-Sonden für die Northern Blot Analyse der Rpe65-Norrin Mäuse zurückgegriffen werden (Ohlmann *et al.* 2010). Diese Sonden wurden von Ohlmann *et al.* wie folgt hergestellt. Mittels PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz mit Norrin-Primerpaaren (vgl. 3.1.3) und der DNA des Rpe65-Norrin Plasmids (als Matrize) durch Initiation bei 94 °C für 2 min, 35 Zyklen von Denaturierung bei 94 °C für 30 s, von Annealing bei 55 °C für 45 s sowie von Elongation bei 72 °C für 90 s und der einmaligen End-Elongation bei 72 °C für 10 min ein murines Norrin-cDNA-Fragment (495 bp) amplifiziert (Ohlmann *et al.* 2010). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel aufgereinigt und in pCR II-Topo (Life Technologies, Paisley, UK) kloniert (Ohlmann *et al.* 2010). Der Vektor wurde dann mit dem Restriktionsenzym HindIII (New England Biolabs, Frankfurt am Main) linearisiert (Ohlmann *et al.* 2010). Mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (Roche, Mannheim) wurden die Antisense-RNA-Sonden für Norrin mittels T7-Polymerase amplifiziert und mit DIG-11-UTP markiert (Ohlmann *et al.* 2010).

Je 10 µg RNA der zu untersuchenden Proben wurden mit Northern-Proben-Puffer (vgl. 3.1.5) gemischt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde ein Formaldehyd-haltiges Northern Blot Agarosegel (vgl. 3.1.5) mit den vorbehandelten Proben beladen. Die Proben wurden zunächst für 15 min bei 100 V einlaufen gelassen und daraufhin für 120 min bei 120 V aufgetrennt. 1x MOPS (vgl. 3.1.5) wurde als Laufpuffer verwendet. Nach der Auftrennung wurde das Gel 2x für mindestens 10 min mit 20x SSC (vgl. 3.1.5) gewaschen. Der Kapillar-Blot-Transfer der aufgetrennten RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte üN nach folgendem Aufbau:

Aufbau Northern Blot

Gewicht (Metallblock)
5-6 cm Papierhandtücher
3 Whatman-Papiere (trocken)
2 Whatman-Papiere (getränkt mit 20x SSC)
Nylon-Membran (getränkt mit 20x SSC)
Northern Blot Agarosegel
2 Whatman-Papiere (getränkt mit 20x SSC)
1 Docht aus Whatman-Papier (getränkt mit 20x SSC, steht in Kontakt mit Pufferreservoir)
Pufferreservoir (20x SSC)

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz an Raumluft getrocknet. Sodann wurde die Membran in einen Crosslinker (Stratagene, Cedar Creek, USA) für 28 s mit UV-Licht (0,140 J) bestrahlt, um die RNA an die Membran zu binden. Zur Ladungskontrolle wurde die 28S- und 18S-rRNA-Bande eingefärbt. Hierzu wurde die Membran mit Methylenblau-Lösung inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O dest. entfärbt, bis die Banden zu sehen waren. Die Banden wurden mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert. Daraufhin wurde die Nylonmembran bei 60 °C mit 15 ml Dig Easy Hyb (Roche, Mannheim) für 45 min im Hybridizer HB-1000 (UVP Laboratory Products, Upland, USA) prähybridisiert. Im Anschluss daran wurde die Membran üN bei 60 °C mit den Sonden in 10 ml Dig Easy Hyb hybridisiert. Die Sonden (10 µl Sonde in 100 µl H<sub>2</sub>O) wurden vor Zugabe für 10 min bei 95 °C inkubiert und 2 min auf Eis heruntergekühlt. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran 2x für 5 min in einer 2x SSC-Lösung mit 0,1 % SDS (vgl. 3.1.5) bei RT und dann 2x für 15 min in einer 0,2x SSC-Lösung mit 0,1 % SDS bei 70 °C gewaschen. Daraufhin wurde die Membran kurz mit Maleinsäurewaschpuffer (vgl. 3.1.5) bei RT gespült und 30 min bei RT mit 1x DIG Blocking Reagent (vgl. 3.1.5) blockiert. Um die gebundenen Sonden sichtbar zu machen, wurde die Membran zunächst mit AP-konjugierten anti-Digoxigenin Antikörpern (Roche Mannheim), welche an die DIG-Markierung der Sonden binden, für 30 min bei RT inkubiert. Die Antikörper waren hierfür 1:10000 mit 1x DIG Blocking Reagent verdünnt. Nach der Antikörperinkubation wurde 3x 10 min bei RT mit Maleinsäurewaschpuffer gewaschen und die Membran sodann für 5 min bei RT mit Detektionspuffer (Tris-HCl 100 mM, Natriumchlorid 100 mM, pH 9,5) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mit CDP-Star Substrat (Roche, Mannheim), 1:100 verdünnt in Detektionspuffer, bedeckt. Durch die Chemilumineszenz, welche

bei der Umsetzung des Substrates durch die an die Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) entstand, konnten die gebunden Sonden schließlich mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert werden. Das aufgenommene Chemilumineszenz-Signal wurde mit einem digitalen Bild dokumentiert und mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) analysiert.

### 3.4.7 cDNA-Herstellung

Für quantitative real-time RT(Reverse-Transkriptions)-PCR Analysen (vgl. 3.4.8) wurde die RNA der Proben mit Hilfe einer reversen Transkriptase in die stabile cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben, welche dann als DNA-Matrize diente. Für die Herstellung der cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, München) eingesetzt. Zur cDNA-Synthese wurden die in Tabelle 25 aufgelisteten Reaktionsansätze verwendet, wobei pro Probe jeweils ein Ansatz mit (+RT) und einer ohne reverse Transkriptase (-RT) pipettiert wurde. Die –RT-Ansätze wurden bei der quantitativen real-time RT-PCR eingesetzt, um mögliche DNA-Kontaminationen der Proben zu erkennen. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) nach dem Programm von Tabelle 26. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 25: 10 µl Reaktionsansätze (1x) für cDNA-Synthese**

Komponenten	Volumen +RT-Ansatz	Volumen -RT-Ansatz
0,5 µg RNA und H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	7,5 µl	10 µl
5x iScript™ Reaction Mix	2,0 µl	
iScript™ Reverse Transkriptase	0,5 µl	

**Tabelle 26: Thermocyclerprogramm für cDNA-Synthese**

Schritt	Temperatur	Dauer
1	25 °C	5 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	10 °C	∞

### 3.4.8 Quantitative real-time RT-PCR

Die quantitative real-time RT(Reverse-Transkriptions)-PCR wurde genutzt, um die Expression von IGF-1 in den RNA-Proben von behandelten Zellen (vgl. 3.2.6) und der retinalen RNA von FVB/N Mäusen bei Normoxie bzw. von Mäusen im OIR-Modell (vgl. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) zu analysieren. Um die relative IGF-1-Expression quantifizieren zu können, wurde die IGF-1(Zielgen)-Expression im Verhältnis zur Expression des Referenzgens GNB2L1 (für HDMEC) bzw. Gapdh (für murine Retinae und Müllerzellen aus der Ratte) untersucht.

Bei der quantitativen real-time RT(Reverse-Transkriptions)-PCR dient die durch reverse Transkription aus der RNA der Proben synthetisierte cDNA als DNA-Matrize für die Reaktionsansätze (vgl. Tabelle 27). Für jede +RT-Probe (vgl. 3.4.7) wurden mit den Primern (vgl. 3.1.3) für das Zielgen bzw. das Referenzgen jeweils Dreifachansätze in eine 96-Well iCycler IQ PCR Platte (BioRad, München) pipettiert, während die –RT-Proben nur jeweils in Einzelansätzen untersucht wurden. Nach dem Pipettieren der Reaktionsansätze wurde die Platte mit einem Microseal<sup>®</sup> B' Film (BioRad, München) verschlossen und kurz abzentrifugiert.

Durch Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green I in den Reaktionsansätzen kann, durch Detektion der bei der Interkalation des Farbstoffs in doppelsträngige DNA auftretenden Fluoreszenz, die Zunahme der PCR-Produkte während der Amplifikation („real-time“, in Echtzeit) aufgezeichnet werden (Wong & Medrano 2005). Dies ist möglich, da die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der doppelsträngigen DNA zunimmt (Wittwer *et al.* 1997; Wong & Medrano 2005). Der sogenannte  $C_t$  („Cycle threshold“)-Wert gibt dabei den Zyklus an, bei dem die detektierte Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt (Wong & Medrano 2005). Je niedriger der  $C_t$ -Wert ist, desto größer ist also die Menge der Ziel-cDNA-Matrize (Wong & Medrano 2005).

Die Amplifikation sowie die Schmelzkurve nach dem Programm in Tabelle 28 und die Detektion der Fluoreszenz erfolgten im IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler (BioRad, München). Mit Hilfe der Schmelzkurve kann nach dem Lauf die Spezifität des Produkts überprüft werden (Wong & Medrano 2005). Hierzu wurde das Programm iQ Optical System Software Version 3.0a (BioRad, München) benutzt. Mit dem gleichen Programm und dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 (Microsoft<sup>®</sup> Corporation, Redmond, USA) wurden die Daten

ausgewertet und nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode die relative Expression bestimmt (Schmittgen & Livak 2008).

**Tabelle 27: 15 µl Reaktionsansatz (1x) für die quantitative real-time PCR**

Komponenten	Volumen
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	12,005 µl
10x Puffer (Qiagen)	1,5 µl
Magnesiumchlorid (25 mM; Qiagen)	0,6 µl
SYBR-Green I	0,39 µl
cDNA-Syntheseprodukt (+RT bzw. -RT)	0,15 µl
dNTPs (25 mM, Qiagen)	0,12 µl
Primer forward (1 µM)	0,08 µl
Primer reverse (1 µM)	0,08 µl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/µl; Qiagen)	0,06 µl
Fluorescein (1:100)	0,015 µl

**Tabelle 28: Cyclorprogramm für die quantitative real-time PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	15 min
2 (40x)	95 °C 60 °C	10 s 40 s
3	95 °C	1 min
4	55 °C	1 min
5 (81x)	55 °C + 0,5 °C pro Zyklus (für Schmelzkurve)	6 s
6	4 °C	∞

## 3.5 Proteinbiochemische Techniken

### 3.5.1 Proteinextraktion

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus Mausretinae und Zellen wurden 2 verschiedene Methoden (vgl. 3.5.1.1 und 3.5.1.2) angewendet.

### 3.5.1.1 Extraktion mit RIPA-Puffer

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus behandelten Zellen (vgl. 3.2.6) mit RIPA („Radio immuno precipitation assay“)-Puffer, wurden die Zellen jeweils mit 300 µl RIPA-Puffer (vgl. 3.1.5; versetzt mit 1: 1000 Protease-Inhibitor-Mix M) für 10 min auf Eis behandelt. Die Zellen wurden sodann mittels Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 11000 UpM sowie 4 °C zentrifugiert. Das Pellet mit unlöslichen Fragmenten wurde entfernt und der Überstand mit dem extrahierten Gesamtprotein wurde bis zur weiteren Untersuchung kurzfristig bei -20 °C oder längerfristig bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion von Gesamtprotein aus murinen Retinae (vgl. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) mit RIPA-Puffer, wurden die Retinae in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pro Retina 150 µl RIPA-Puffer (versetzt mit 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix M) zugegeben und die Retinae mit einem Mikrohomogenisator (Roth, Karlsruhe) homogenisiert. Die Retinae wurden anschließend 10 min bei 4 °C inkubiert und, wie für die Zellen beschrieben, unlösliche Bestandteile mit Hilfe der Zentrifugation entfernt.

### 3.5.1.2 TriFast™ Methode

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus murinen Retinae (vgl. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) mit TriFast™ wurde die von Chomczynski publizierte Methode verwendet (Chomczynski 1993). Hierfür wurde zunächst nach dem für die RNA-Extraktion mit TriFast™ (vgl. 3.4.4) beschriebenen Protokoll vorgegangen. Mit der Interphase und der organischen Phenol-Chloroform-Phase der RNA-Extraktion wurde im Anschluss, nach der Anleitung von peqGOLD TriFast™ (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), wie folgt verfahren:

#### Protokoll der Proteinextraktion mit TriFast™

- zu Interphase und organischer Phenol-Chloroform-Phase der RNA-Extraktion (vgl. 3.4.4) 300 µl 100 % Ethanol geben und vortexen
- 3 min bei RT inkubieren
- 15 min bei 2000 x g 4 °C zentrifugieren
- Pellet mit DNA-Präzipitat verwerfen



- Überstand in neuem Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Isopropanol mischen
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen
- präzipitiertes Proteinpellet 3x mit 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid (in 95 % Ethanol) durch Inkubation für 20 min bei RT und Zentrifugation für 5 min bei 7500 x g sowie 4 °C waschen
- Proteinpellet in 2 ml 100 % Ethanol vortexen, 20 min bei RT inkubieren und 5 min bei 7500 x g sowie 4 °C zentrifugieren
- Pellet in 200 µl 1 % SDS (versetzt mit 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix M) aufnehmen und üN bei 50 °C inkubieren
- 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Proteinüberstand in neues Reaktionsgefäß überführen
- Proteinlösung bei -20 °C bzw. -80°C lagern

### 3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay

Die Konzentration der extrahierten Proteine wurde mit Hilfe des BCA-Assays, nach einer von Smith *et al.* beschriebenen Methode, bestimmt (Smith *et al.* 1985). Dabei reagieren Proteine (Biuret-Reaktion) in alkalischer Umgebung mit  $\text{Cu}^{2+}$  (Smith *et al.* 1985). Das dadurch gebildete  $\text{Cu}^{1+}$  bildet mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, wobei die Färbung proportional mit der Proteinkonzentration zunimmt und durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden kann (Smith *et al.* 1985). Eine BSA (bovines Serumalbumin)-Verdünnungsreihe (1000 µg/ml bis 100 µg/ml) diente bei den durchgeführten BCA-Assays der Erstellung einer Eichkurve. Das BSA wurde dabei, je nach den zu untersuchenden Proteinproben, mit 1 % SDS (versetzt mit 1: 1000 Protease-Inhibitor-Mix M) bzw. RIPA-Puffer (versetzt mit 1:1000 Protease-Inhibitor-Mix M) verdünnt. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden jeweils 10 µl der einzelnen Verdünnungen des BSA-Standards und je 10 µl der Proteinproben (unverdünnt, 1:5 und 1:10 verdünnt) in Doppelansätzen auf eine 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde in jedes Well 200 µl BC Assay Reagenz A+B (Interchim, Wörgl, AUT) zugegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde mit dem Spektral-

photometer Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, AUT) gemessen. Die Proteinkonzentration ergab sich durch Abgleich mit der Eichgeraden als Mittelwert der Doppelansätze.

### **3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das mit dem RIPA-Puffer extrahierte Gesamtprotein aus Zellen bzw. den murinen Mausretinae und die Proteine in den Fraktionen der Norrinaufreinigung wurden mit Hilfe der SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), nach der von Laemmli beschriebenen Methode; in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli 1970). Für die SDS-PAGE kam eine vertikale Gelelektrophoresekammer (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) zum Einsatz. Das SDS-Gel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel (vgl. 3.1.5), wurde zwischen 2 Glasplatten hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel, in welchem die Auftrennung der Proteine erfolgt, gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Für die Western Blot Analyse von  $\beta$ -Catenin wurde ein 10 % Trenngel und für die Untersuchung von IGF-1 und penta-His sowie für die Silberfärbung ein 15 % Trenngel verwendet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt, die Lösung für das Sammelgel zugegeben und ein Plastikkamm als Abschluss eingesetzt. Sobald das Sammelgel, in dem die Proteinproben vor der Auftrennung im Trenngel konzentriert werden, auspolymerisiert war, konnte der Kamm entnommen werden, wodurch Taschen zum Laden der Proteinproben freigegeben wurden. Die Proteinproben (15  $\mu$ g bis 40  $\mu$ g Protein) wurden zusammen mit dem reduzierenden 1x SDS-Probenpuffer für 10 min gekocht und somit denaturiert. Sodann wurde in die Pufferkammer, der Gelelektrophoresekammer mit den SDS-Gelen, 1x Elektrodenpuffer gegeben und die Proteinproben sowie 5  $\mu$ l der PageRuler Prestained Protein-Leiter (Größenstandard) geladen. Die Auftrennung erfolgte für 70 min bei 20 mA (pro Gel). Im Anschluss daran wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für die Silberfärbung (vgl. 3.5.6.2) oder eine Western Blot Analyse genutzt (vgl. 3.5.4 und 3.5.7).

### 3.5.4 Western Blot Transfer

Für Western Blot Analysen wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben aus dem SDS-Trenngel elektrophoretisch auf eine PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Dies geschah in einer Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mittels Semidry-Verfahren, bei dem der Einsatz von Transferpuffer (vgl. 3.1.5) stark reduziert ist. Der Semidry Blot war wie folgt aufgebaut:

#### Aufbau Semidry Blot

Kathode
3 Whatman-Papiere (getränkt mit Transferpuffer)
SDS-Gel
PVDF-Membran (getränkt mit Methanol und äquilibriert mit Transferpuffer)
2 Whatman-Papiere (getränkt mit Transferpuffer)
Anode

Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 min bei 25 V. Anschließend wurde das zu analysierende Protein mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (vgl. 3.5.7).

### 3.5.5 Dot Blot Transfer

Zur Untersuchung spezifischer Proteine in dem Zellüberstand von behandelten HDMEC (vgl. 3.2.6) bzw. im murinen retinalen Gesamtprotein, welches mit Hilfe von TriFast™ extrahiert wurde, kamen Dot Blot Analysen zum Einsatz. Bei diesem Verfahren wurden die Proteinproben, ohne vorhergehende Auftrennung, direkt durch Vakuumfiltration auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurden je 40 µg der Proteinproben bzw. 700 µl des Zellüberstands 10 min aufgekocht und auf diese Weise denaturiert. Die Proben wurden dann, bei angelegtem Vakuum, in jeweils ein Loch des Aufsatzes der Minifold I-SRC96-Dot Blot Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) überführt, welche für den Vakuumfiltrationstransfer wie folgt aufgebaut war:

#### Aufbau Dot Blot

96-Loch Aufsatz
PVDF-Membran (getränkt mit Methanol und äquilibriert mit Transferpuffer)
1 Whatman-Papier (getränkt mit Transferpuffer)
Filterträgerplatte
Vakuumkammer (Vakuum erzeugt über Wasserstrahlpumpe)

Nach dem erfolgten Transfer der Proteinproben auf die PVDF-Membran wurde das zu analysierende Protein mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (vgl. 3.5.7).

### **3.5.6 Färbemethoden für Proteine**

#### **3.5.6.1 Coomassie-Färbung**

Um Proteine auf der PVDF-Membran nachzuweisen, wurde Coomassie verwendet. Bei Coomassie® Brillant Blue R-250 handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, welcher Proteinbanden ab einer Menge von 0,1 µg anfärben kann (Berg *et al.* 2003). Die Coomassie-Färbung diente als Ladungskontrolle bei den Dot Blot Analysen (vgl. 3.5.5). Nach der Antikörperinkubation und der Detektion des Chemilumineszenz-Signals, wurden die PVDF-Membran hierfür 2x 10 min bei RT mit TBST gespült. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 56 °C mit Roti®-Free Stripping-Puffer behandelt und so die Antikörper abgelöst, um bei der Coomassie-Färbung ausschließlich das Protein der Proben zu markieren. Daraufhin wurde die PVDF-Membran nochmal 2x 10 min bei RT mit TBST gespült. Sodann wurde die Membran 15 min bei RT in Coomassie-Färbelösung (vgl. 3.1.5) gefärbt und 15 min bei RT in Coomassie-Entfärbelösung (vgl. 3.1.5) inkubiert. Als nächstes wurde die PVDF-Membran mit den angefärbten Proteinen getrocknet, mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert und die Färbung mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) densitometrisch vermessen.

### **3.5.6.2 Silberfärbung**

Um den Erfolg der Norrin-Aufreinigung (vgl. 3.5.8) zu untersuchen und für die semi-quantitative Bestimmung der Norrin-Konzentration (vgl. 3.5.8.3), wurden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine im SDS-Gel mit Silber, nach einer Methode von Heukeshoven und Dernick, gefärbt (Heukeshoven & Dernick 1988). Bei dieser sensitiven Methode liegt die Nachweisgrenze zwischen 50 und 100 pg Protein pro Bande (Heukeshoven & Dernick 1988). Die Färbung von SDS-Gelen nach SDS-PAGE wurde mit frisch angesetzten Lösungen (vgl. 3.1.5) wie folgt durchgeführt:

#### Protokoll der Silberfärbung

- 30 min Fixierlösung I
- 30 min Fixierlösung II
- 3x 5 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 20 min Silberlösung
- 2x 1 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 2–10 Minuten Entwicklungslösung
- 10 min Stopplösung
- 3x 5 min waschen mit H<sub>2</sub>O dest.
- 15 min (bis zu 6 Monate) Konservierungslösung

### **3.5.7 Nachweis spezifischer Proteine in Western und Dot Blot Analysen**

Zum Nachweis spezifischer Proteine (vgl. Tabelle 29) auf PVDF-Membranen, nach dem Western Blot oder Dot Blot Transfer der zu analysierenden Proteinproben, kamen Primär- und Sekundärantikörper zum Einsatz. Die primären, gegen das gesuchte Antigen gerichteten Antikörper waren nicht direkt mit einem Nachweismarker versehen. Aus diesem Grund kamen HRP-konjugierte Sekundärantikörper zum Einsatz, welche ein Epitop der Primärantikörper erkennen. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert, bei Zugabe eines HRP-Substrats, eine Reaktion bei der es zu Chemilumineszenz-Emission kommt. Der

Nachweis dieser Chemilumineszenz-Emission zeigt das Vorhandensein des gesuchten Proteins in der Probe an.

Im Vorfeld der Antikörperinkubation wurden die PVDF-Membranen blockiert, wodurch eine potentielle, unspezifische Bindung der Antikörper minimiert wurde. Die Blockierung und die Antikörperinkubation erfolgten wie in Tabelle 30 vermerkt.

**Tabelle 29: Liste der nachgewiesenen Proteine und der dazu analysierten Proben**

Nachweis von	Nachweis in
IGF-1	Zellüberstand HDMEC (rhNorrin-behandelt); Gesamtprotein von $\beta$ B1-Norrin/FVB/N bzw. FVB/N nach OIR
Penta-His	dialysierte Eluate der Norrin-Aufreinigung
$\beta$ -Catenin	Gesamtprotein von HDMEC (LiCl-, SB216763, rhNorrin-behandelt), Pax6-Norrin und LiCl-injizierten FVB/N)

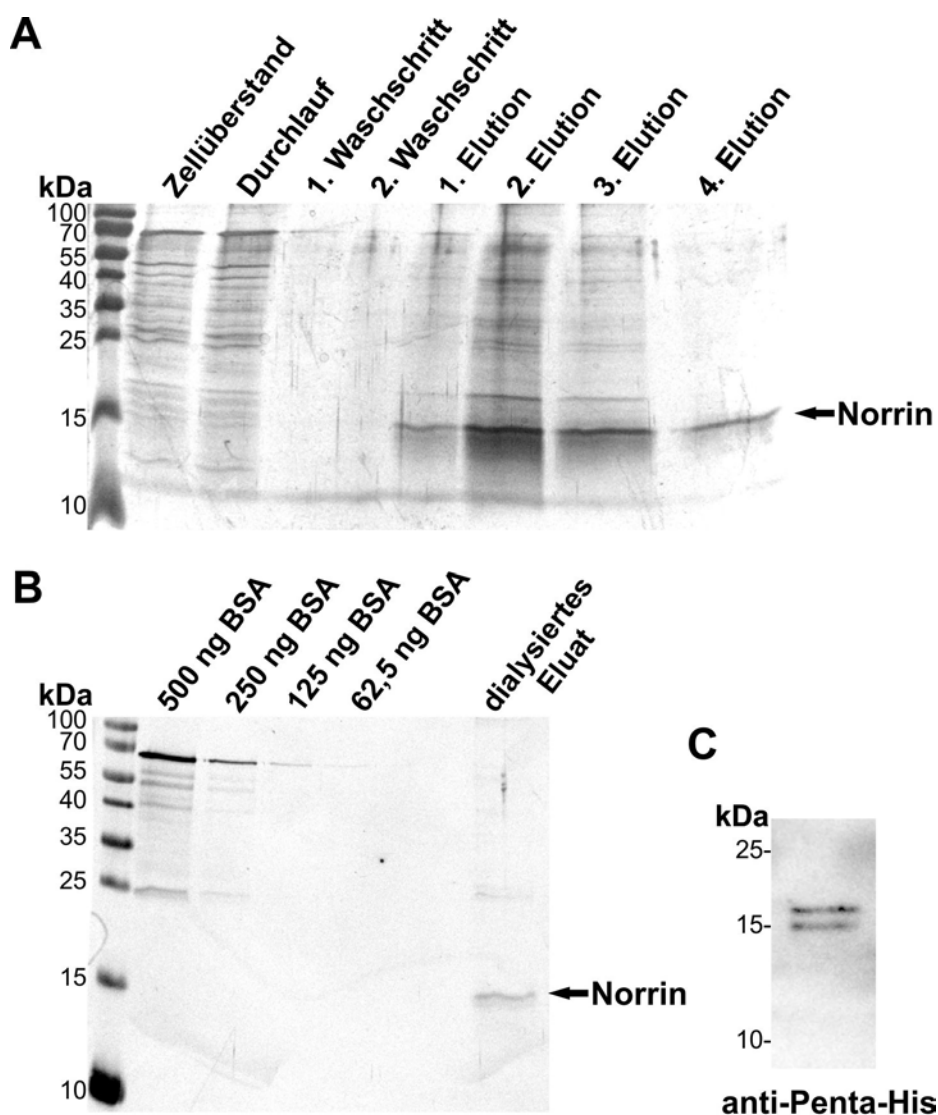
**Tabelle 30: Protokolle für die Blockierung und Antikörperinkubation zum Nachweis spezifische Proteine**

Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
5 % MM in TBST, 1 h, RT	rabbit-anti- $\beta$ -Catenin 1:1000 in 5 % BSA (TBST), üN, 4 °C	HRP-konjugierte goat-anti-rabbit 1:2000 in 5 % MM (TBST), 1 h, RT
5 % BSA in TBST, 1 h, RT	goat-anti-IGF-1 1:500 in 0,5 % BSA (TBST), üN, 4 °C	HRP-konjugierte donkey-anti-goat 1:2000 in 0,5 % BSA (TBST), 1h, RT
3 % BSA in TBST, 1h RT	mouse-anti-Penta-His 1:2000 in 0,3 % BSA (TBST), üN, 4°C	HRP-konjugierte horse-anti-mouse 1:2000 in 5 % MM (TBST), 1 h, RT
5 % MM in TBST, 30 min, RT	HRP-konjugierte rabbit-anti-GAPDH 1:5000 in 5 % MM (TBST), 1 h, RT	

Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern bzw. den Sekundärantikörpern wurde jeweils 3x 10 min mit TBST gespült. Sodann wurden die PVDF-Membranen für 5 min bei RT mit Immobilon™Western HRP Substrat bedeckt. Daraufhin wurde das Chemilumineszenz-Signal mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert und in einem digitalen Bild dokumentiert. In diesem wurde das aufgenommene Chemilumineszenz-Signal dann mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) für Expressionsanalysen densitometrisch vermessen.

Zur Landungskontrolle bei sämtlichen Western Blot Analysen wurde die PVDF-Membran nach der Detektion des Chemilumineszenz-Signals 2x 10 min bei RT mit TBST gespült, anschließend GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) mit HRP-konjugierten Antikörpern direkt nachgewiesen (vgl. Tabelle 30) und das Chemilumineszenz-Signal densitometrisch vermessen. Bei den Dot Blot Analysen wurde die Ladung mit Hilfe der Coomassie-Färbung (vgl. 3.5.6.1) überprüft.

### 3.5.8 Aufreinigung von rhNorrin



**Abb. 9: Aufreinigung von rhNorrin.**

A: SDS-PAGE und Silberfärbung von den Fraktionen der Heparin Chromatographie. Im 4. Eluat liegt rhNorrin, angereicht und nahezu frei von Nebenbanden, auf einer Höhe von ca. 17 kDa (Pfeil) vor. B: Bestimmung der Proteinkonzentration von rhNorrin (Pfeil, ca. 17 kDa) im dialysierten Eluat durch Vergleich mit einem BSA-Proteinstandard in einer SDS-PAGE nach Silberfärbung. C: Western Blot Analyse des dialysierten Eluats mit anti-Penta-His Antikörpern.

Das rhNorrin wurde aus rhNorrin-haltigem Zellüberstand von EBNA-pSNOS Zellen (vgl. 3.2.4) mit Hilfe der Heparin Chromatographie (vgl. 3.5.8.1) aufgereinigt. In der Silberfärbung (vgl. 3.5.6.2) der Fraktionen fand sich rhNorrin auf einer Höhe ca. 17 kDa (vgl. Abb. 9 A) und entsprach damit dem berechneten Molekulargewicht. Die Elutionen, in denen Norrin frei von Nebenbanden vorlag, wurden dialysiert (vgl. 3.5.8.2), mit Hilfe der semiquantitativen Silberfärbung die Norrin-Konzentration bestimmt (vgl. Abb. 9 B) und der His-Tag des rhNorrins (vgl. 3.2.4) in einer Western Blot Analyse (vgl. 3.5.4 und 3.5.7) von 30 µl des dialysierten Eluats mit anti-Penta-His Antikörpern nachgewiesen (vgl. Abb. 9 C). Bei der Untersuchung mit anti-Penta-His Antikörpern fanden sich, wie von Ohlmann *et al.* beschrieben, Banden auf einer Höhe von ca. 17 kDa (Ohlmann *et al.* 2010). Außerdem wurde die Bioaktivität des rekombinanten Norrins getestet (vgl. 3.5.8.4).

### 3.5.8.1 Heparin Chromatographie

Zur Aufreinigung des rhNorrin aus rhNorrin-haltigem Zellüberstand von EBNA-pSNOS Zellen (vgl. 3.2.4) wurde, wie von Ohlmann *et al.* beschrieben, die Heparin-Agarose Affinitätschromatographie eingesetzt (Ohlmann *et al.* 2010). Hierbei wird die hohe Affinität Norrins zu Heparin (Smallwood *et al.* 2007) ausgenutzt. Die Affinitätschromatographie zur Norrin-Aufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:

#### Protokoll der Heparin Chromatographie:

- 500 ml Zellüberstand von EBNA-pSNOS mit 180 µl Heparin-Agarose für 30 min bei 4 °C äquilibrieren
- Zellüberstand mit Heparin-Agarose auf Polypropylen Chromatographiesäule laden
- 500 µl von Zellüberstand und Durchlauf auffangen, restlichen Durchlauf verwerfen
- 2x mit 20 ml 1x PBS waschen, jeweils 500 µl der beiden Waschschriffe auffangen
- Norrin eluieren: 2x mit 500 µl 1 M Natriumchlorid (in 1x PBS) und 2x mit 500 µl 2 M Natriumchlorid (in 1x PBS)
- 1.-4.Elution getrennt auffangen



Nach der Elution wurden die aufgefangenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (vgl. 3.5.3) aufgetrennt und einer Silberfärbung (vgl. 3.5.6.2) unterzogen. Hierdurch konnte der Erfolg der Aufreinigung und die Reinheit der aufgefangenen Elutionen überprüft werden (vgl. Abb. 9 A).

### **3.5.8.2 Proteindialyse**

Elutionen der Norrin-Aufreinigung, die sich bei der Silberfärbung (vgl. 3.5.6.2) als frei von Nebenbanden erwiesen (vgl. Abb. 9 A), wurden anschließend dialysiert. Hierfür wurde der Spectra Por7 Dialyseschlauch (MWCO 3500) zunächst 10 min in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Anschließend wurde die zu dialysierende Elution in den Dialyseschlauch transferiert. Für die Dialyse wurde der Schlauch mit Verschlussclips auf beiden Seiten verschlossen. Sodann wurde üN gegen 2,5 l 1x PBS bei 4 °C, unter kontinuierlichem Rühren, dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Konzentration des dialysierten rhNorrins bestimmt (vgl. 3.5.8.3), das dialysierte Eluat aliquotiert und die rhNorrin-Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.5.8.3 Bestimmung der Norrin-Konzentration**

Die Konzentration des aufgereinigten rhNorrins in den dialysierten Eluaten wurde mit Hilfe einer semiquantitativen Silberfärbung bestimmt. Hierfür wurden 30 µl des dialysierten Eluats und ein BSA-Standard (500 ng, 250 ng, 125 ng und 62,5 ng BSA) mittels SDS-PAGE (vgl. 3.5.3) aufgetrennt und einer Silberfärbung (vgl. 3.5.6.2) unterzogen (vgl. Abb. 9 B). Anhand des Vergleichs der Intensität der Norrin-Bande bei 17 kDa mit den BSA-Banden des BSA-Standards bei 70 kDa, konnte die Norrin-Konzentration anschließend semiquantitativ bestimmt werden.

### **3.5.8.4 Testung der Bioaktivität**

Um die Bioaktivität des aufgereinigten rhNorrins zu analysieren, wurde dessen Potential zur Stimulation des kanonischen Wnt-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen getestet. Hierfür wurden HDMEC mit rhNorrin behandelt (vgl. 3.2.6) und

das Gesamtprotein der Zellen auf eine Induktion des  $\beta$ -Cateninlevels hin untersucht. Dazu wurden Western Blot Analysen durchgeführt (vgl. 3.5.4 und 3.5.7).

## 3.6 Histologische Techniken

### 3.6.1 Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten

Zur Charakterisierung der Pax6-Norrin Mäuse und der Untersuchung einer möglichen neuroprotektiven Wirkung der Norrin-Überexpression in der inneren Retina wurden Semidünnschnitte der Augen und der *Nn. optici* angefertigt. Hierfür wurden die entnommenen Mauseugen und die zugehörigen, ausgestreckten *Nn. optici* zunächst für 24 h vollständig mit EM-Fixans bedeckt. Um eine bessere Fixierung des Gewebes zu ermöglichen, wurde die Cornea der Augen nach einer Stunde im EM-Fixans geöffnet. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Augen mit ihren Sehnerven viermal je 30 min mit Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend zur Nachfixierung in 1 % Osmiumtetroxid überführt. Das Fixans wurde sodann mit Cacodylatpuffer ausgespült. Zur darauffolgenden Entwässerung des Gewebes kam eine aufsteigende Ethanolreihe (70, 80, 90, 100%) zum Einsatz. Die Eponeinbettung wurde im Einbettautomaten EM TP (Leica, Wetzlar) durchgeführt, wobei die Augen und die Sehnerven in 100 % Propylenoxid, Propylenoxid/Epon (2:1), Propylenoxid/Epon (1:1), Propylenoxid/Epon (1:2) und schließlich in 100 % Epon überführt wurden. Hierfür wurde eine Eponmischung aus Stammlösung A und Stammlösung B (im Verhältnis 1:1; vgl. 3.1.5) mit einem Anteil des Beschleunigers DPM-30 von 2 % eingesetzt. In einem letzten Schritt wurde das Epon durch 48-stündige Inkubation im Brutschrank bei 60 °C auspolymerisiert. Semidünnschnitte von 1  $\mu$ m Dicke wurden mit Hilfe des Ultracut E-Ultramikrotom (Reichert-Jung, Kirchseeon) hergestellt, auf einem Objektträger aufgenommen und bis zur anschließenden Färbung (vgl. 3.6.2) bei RT gelagert.

### **3.6.2 Histologische Färbemethoden**

#### **3.6.2.1 Färbung mit Paraphenyldiamin**

Die sagittalen Semidünnschnitte der *Nn. optici* wurden, wie bei Schultze beschrieben, gefärbt (Schultze 1972). Hierfür wurde Paraphenyldiamin zunächst gelöst (vgl. 3.1.5) und für 3 Tage bei RT und Tageslicht gelagert, bis eine dunkle Färbung der Lösung zu erkennen war. Zur Kontrastierung wurden die Sehnervenschnitte 2-3 min bei RT mit dem gelösten Paraphenyldiamin bedeckt. Anschließend wurde die Färbelösung von den Semidünnschnitten mit Ethanol entfernt. Die gefärbten Schnitte wurden dann bis zur lichtmikroskopischen Analyse (vgl. 3.7) bei RT aufbewahrt.

#### **3.6.2.2 Färbung nach Richardson**

Nach der von Richardson *et al.* beschriebenen Methode wurden die sagittalen Semidünnschnitte der Augen eingefärbt (Richardson *et al.* 1960). Dabei wurden die Semidünnschnitte zwischen 30 s bei 60 °C mit der Gebrauchslösung (vgl. 3.1.5) bedeckt und anschließend gründlich mit H<sub>2</sub>O dest. abgewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden bis zur mikroskopischen Auswertung (vgl. 3.7) bei RT gelagert.

### **3.6.3 Kryoeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten**

Für immunhistochemische  $\beta$ -Catenin-Färbungen wurden sagittale Kryoschnitte der Pax6-Norrin- und der LiCl-injizierten-Mausaugen angefertigt. Dafür wurden die enukleierten Augen mit einer kleinen Öffnung in der Cornea versehen, 2 h in 4 % PFA (vgl. 3.1.5) bei RT immersionsfixiert und anschließend 3x für 10 min mit 0,1 M Phosphatpuffer (PhP) gewaschen. Um das Augengewebe zu stabilisieren, wurden die Augen für mindestens je 4 h bei RT in aufsteigenden Konzentrationen einer Saccharose-Lösung (10 %, 20 % bzw. 30 % (w/v) Saccharose in 0,1 M PhP) getaucht. Danach wurden die Augen in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die so entstandenen Kryoblöcke wurden sodann in den Microm HM 500 OM Kryostat (Microm International, Walldorf) überführt und auf Metallblöcken fixiert. Mit Hilfe des Kryostaten wurden sagittale Kryoschnitte der Augen hergestellt und auf

einen SuperFrost®Plus Objektträger transferiert. Die Kryoblöcke wurden für die potentielle Anfertigung weiterer Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.6.4 Immunhistochemische Färbung

Um  $\beta$ -Catenin im Mausauge zu analysieren, wurde dieses Protein in sagittalen Kryoschnitten mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung markiert. Hierzu wurde, wie bei der immunzytochemischen Färbung beschrieben (vgl. 3.2.10), die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Für die Vorbereitung der Augenschnitte auf die Färbung wurden diese 5 min bei RT mit 0,1 M PhP gewaschen, um das Einbettmedium vom Gewebe abzulösen. Im Anschluss daran wurden die Kryoschnitte mit einem Liquid Blocker PAP-Pen umfahren, wodurch das Areal um die Schnitte durch einen hydrophoben Film begrenzt wurde. Vor der Antikörperinkubation wurden die Schnitte noch blockiert, um eine potentielle, unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren. Die Blockierung und die Antikörperinkubation erfolgten wie in Tabelle 31 vermerkt.

**Tabelle 31: Protokoll für die Blockierung und Antikörperinkubation**

Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
3 % BSA und 0,1 % Triton-X-100 in 0,1 M PhP, 45 min, RT	rabbit-anti- $\beta$ -Catenin 1:100 in 1:10 verdünnter Blockierung, üN, 4 °C	Biotin-konjugierte goat-anti-rabbit 1:500 in 1:10 verdünnter Blockierung, 1 h, RT/ Alexa Fluor® 488-konjugiertes Streptavidin 1:1000 in 1:10 verdünnter Blockierung, 1 h, RT

Um die unspezifische Bindung der Sekundärantikörper zu untersuchen, wurden bei einem zusätzlichen Schnitt (Negativkontrolle) die Primärantikörper durch die 1:10 verdünnte Blockierung ersetzt. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern (bzw. 1:10 verdünnter Blockierung), den Biotin-konjugierten Antikörpern und dem Streptavidin wurden die Schnitte jeweils 3x 5 min mit 0,1 M PhP gespült. Sodann wurden die Kryoschnitte mit einem DAPI-haltigen Mounting Medium eingedeckelt. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der mit Licht einer Wellenlänge von 381 nm angeregt wird, diente der direkten Lokalisation der DNA und somit der Zellkerne. Bis

zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (vgl. 3.7) wurden die gefärbten Schnitte bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.7 Mikroskopie

Die Semidünnschnitte, die retinalen Häutchenpräparate, die immunhistochemischen sowie die immunzytochemischen Färbungen wurden mit dem Licht- und Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen. Für die Analyse der immunchemischen Färbungen und der intraretinalen Gefäße kam darüber hinaus das ApoTome Zusatzmodul (Carl Zeiss, Göttingen) zum Einsatz. Zur Dokumentation der Zellmigration wurde das inverse Mikroskop Cell Observer (Carl Zeiss, Göttingen) verwendet. Alle mikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe der Bildanalyse-Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen und verarbeitet. Das inverse Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen) kam bei der Durchführung von *in vitro* Experimenten zur Anwendung. Gewebepreparationen erfolgten unter dem Stereomikroskop Stemi 2000-CS (Carl Zeiss, Göttingen).

### 3.8 Auswertung und Statistik

Die bei den Versuchen erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) ausgewertet. Zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Unterschiede wurden bei  $p$  („Probability“)  $< 0.05$  (\*) als signifikant, bei  $p < 0,01$  (\*\*) als hoch signifikant und bei  $p < 0,001$  (\*\*\*) als höchst signifikant bewertet. Die Säulen-, Punkt- und Liniendiagramme wurden zunächst mit Microsoft® Excel 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) erstellt und anschließend in CorelDRAW® X4 bzw. X5 (Corel® Corporation, Ottawa, CAN) in Vektorgrafiken umgearbeitet. In den Diagrammen wurden Mittelwerte stets zusammen mit ihrem Standardfehler (SEM) dargestellt.

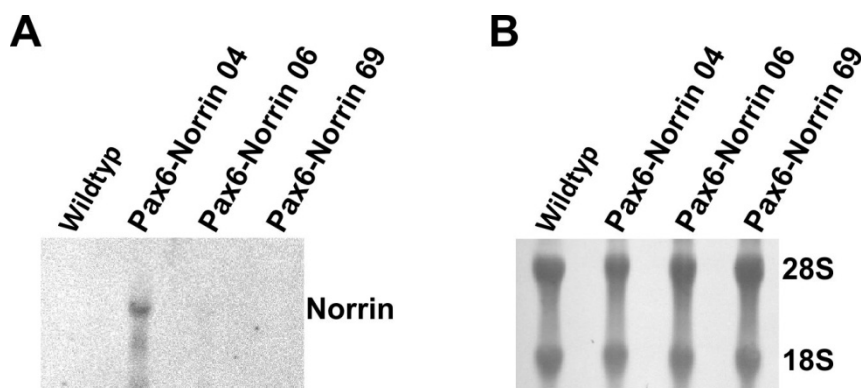
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Pax6-Norrin Mäuse und deren Analyse in RGC-Schadensmodellen

Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die intravitreale Verabreichung von rhNorrin retinale Ganglienzellen der Maus vor einer exzitotoxischen NMDA-vermittelten Schädigung (vgl. 1.3.1) schützt (Seitz *et al.* 2010). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit auch die transgene Überexpression von Norrin in der inneren Netzhaut neuroprotektiv wirken kann. Hierzu wurden zunächst Norrin-überexprimierende Pax6-Norrin Mäuse charakterisiert und anschließend in unterschiedlichen RGC-Schadensmodellen untersucht.

#### 4.1.1 Expression von transgenem Norrin in Pax6-Norrin Mäusen

Im Vorfeld der Doktorarbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits drei unabhängige Pax6-Norrin Linien generiert. Hierbei wurde in FVB/N Mäuse ein Konstrukt eingebracht, in welchem Norrin unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancers des Pax6-Promotors exprimiert wird (vgl. Abb. 7). Das verwendete Promotorkonstrukt vermittelt eine nahezu spezifische Expression in Neuronen der inneren Retina (Marquardt *et al.* 2001).

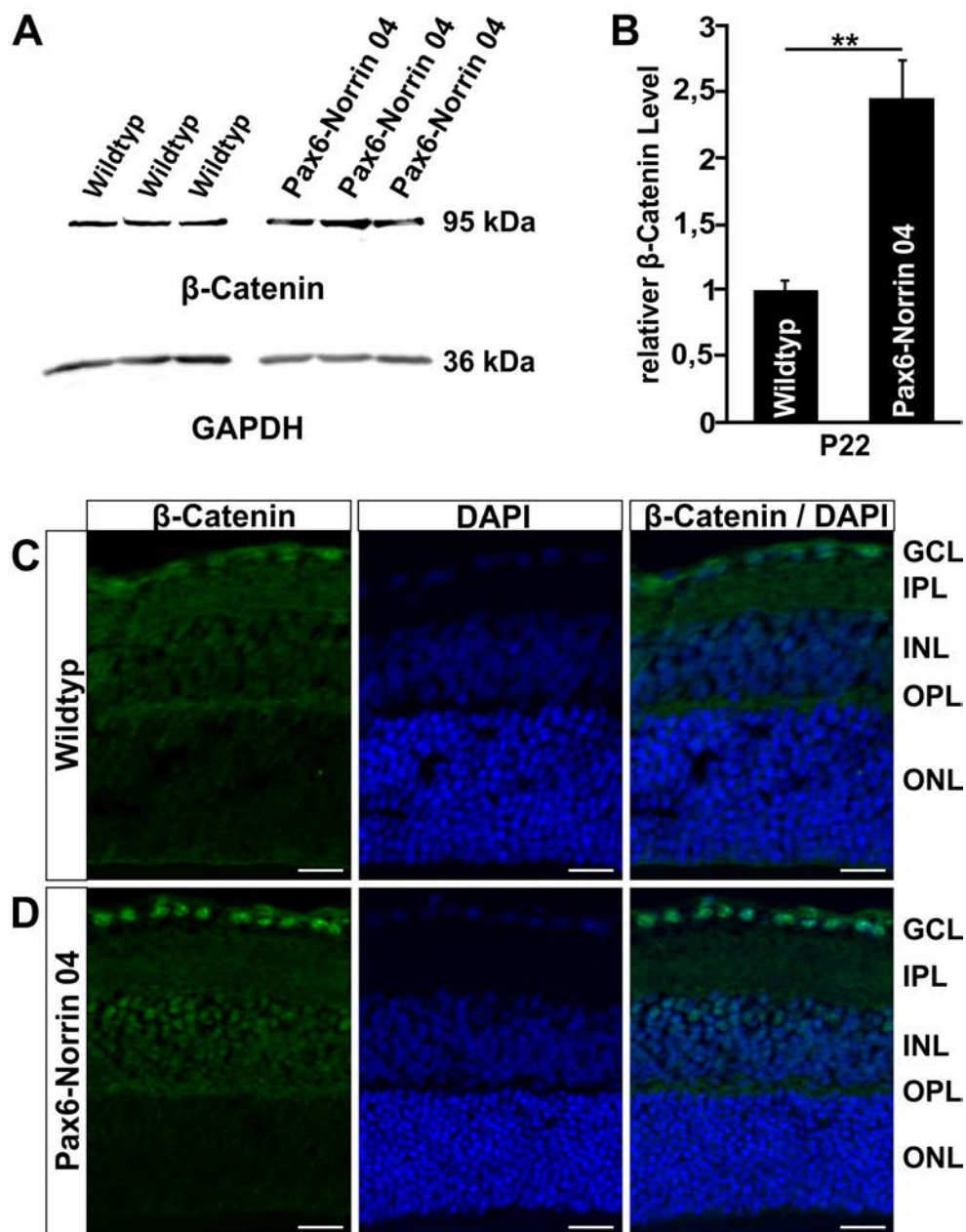


**Abb. 10: Expression transgener Norrin-mRNA in der Netzhaut von Pax6-Norrin 04 Mäusen.**

A: Northern Blot Analyse der transgenen Norrin-mRNA-Expression in der Retina von 3 unabhängigen Pax6-Norrin Mauslinien und Wildtypmäusen an P2 (repräsentativer Northern Blot von insgesamt 3 unabhängigen Analysen mit jeweils identischem Ergebnis). B: Methylenblau-Färbung der Blotting-Membran als Ladungskontrolle.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Expression transgener Norrin-mRNA in der Retina der drei Pax6-Norrin Mauslinien mittels Northern Blot Analysen untersucht. Dafür wurde die RNA aus den Retinae der drei transgenen Linien und FVB/N Wildtypen an P2 isoliert, aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer spezifischen Sonde die transgene Norrin-RNA nachgewiesen. Bei den Northern Blot Untersuchungen konnte ausschließlich in der Pax6-Norrin Mauslinie 04 eine Expression transgener Norrin-mRNA in der Retina gezeigt werden (vgl. Abb. 10).

#### 4.1.2 Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Pax6-Norrin Mäusen



**Abb. 11: Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in der inneren Netzhaut von Pax6-Norrin Mäusen.**

A: Exemplarische Western Blot Analyse des retinalen Gesamtproteins von Pax6-Norrin 04 Mäusen und ihren Wildtypwurfgeschwistern (Alter: P22) mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörpern. GAPDH dient als Ladungskontrolle. B: Densitometrische Auswertung der  $\beta$ -Catenin Western Blot Analysen, normalisiert gegen GAPDH (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 Würfen;  $n = 9$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). C, D: Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (grün) in Retina-Kryoschnitten von Pax6-Norrin 04 Mäusen (C) und Wildtypgeschwistertieren (D) an P22. In Pax6-Norrin 04 Mäusen zeigt sich eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in den Kernen der retinalen Ganglienzellen und der, an die innere plexiforme Schicht angrenzenden Hälfte, der inneren Körnerschicht. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. GCL: Ganglienzellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

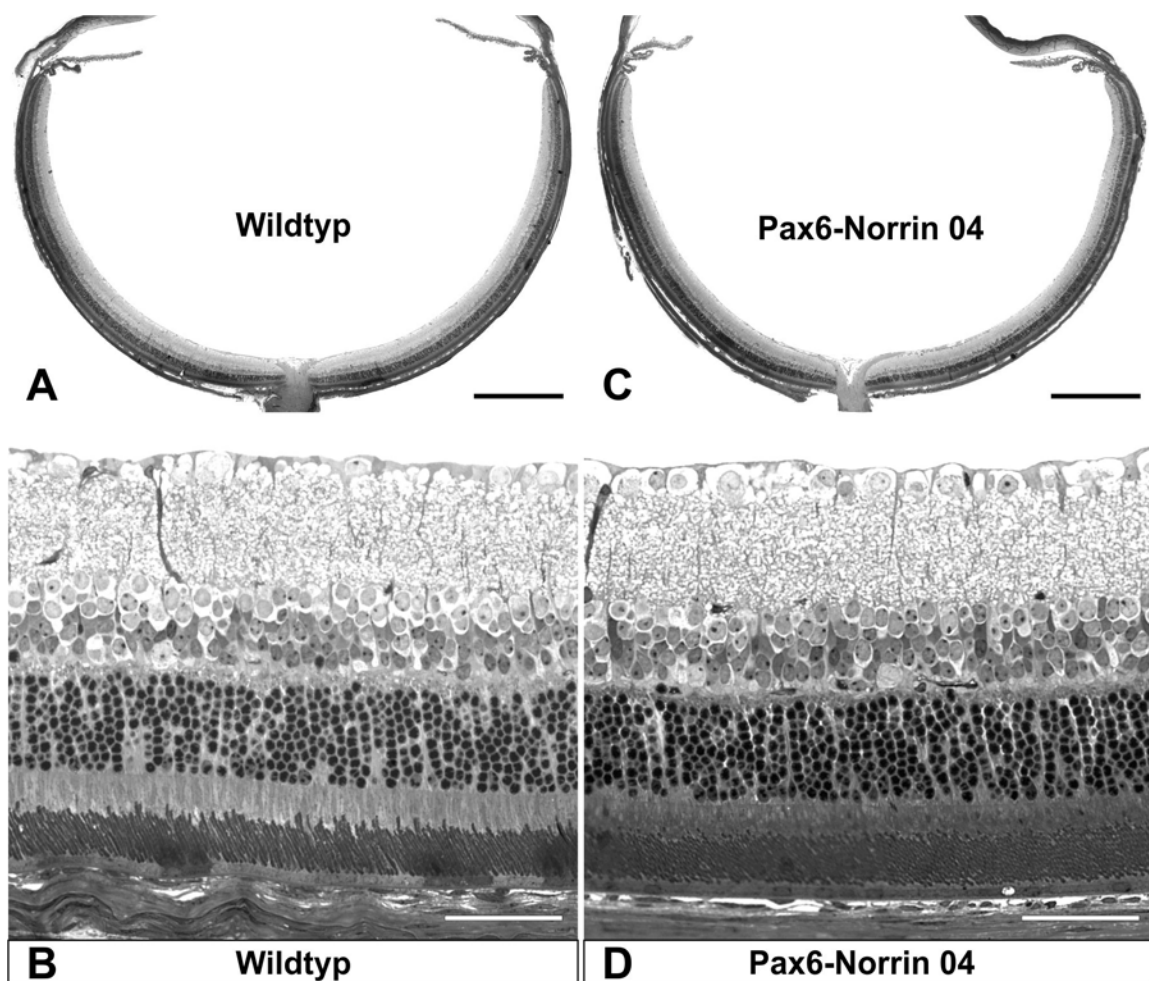
Da Norrin den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert, der bei der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts von Norrin eine wichtige Rolle spielt (Seitz *et al.* 2010), wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob in der inneren Netzhaut der Pax6-Norrin 04 Mäuse (einer F1-Generation aus der Verpaarung einer Pax6-Norrin 04/FVB/N Maus mit einem CD-1 Wildtypen; vgl. 3.3.1) die Expression des transgenen Norrins zu einer Aktivierung des Signalwegs führt. Hierfür wurde zuerst der  $\beta$ -Cateningehalt im retinalen Gesamtprotein von 22 Tage alten transgenen Mäusen und Wildtypgeschwistern mittels Western Blot untersucht (vgl. Abb. 11 A). Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen (vgl. Abb. 11 B) zeigt, dass in den Pax6-Norrin 04 Mäusen der relative  $\beta$ -Catenin Level im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) um das  $2,4 \pm 0,3$ -fache erhöht ist. Um festzustellen, ob  $\beta$ -Catenin nur im Zytoplasma akkumuliert oder auch in den Nukleus transloziert, wodurch eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs stattfindet (vgl. 1.1.4), wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin durchgeführt. In sagittalen Kryoschnitten der Netzhaut an P22, ließ sich im Wildtypen eine schwache Färbung für  $\beta$ -Catenin in den Kernen der retinalen Ganglienzellen erkennen (vgl. Abb. 11 C), während dort im transgenen Tier (vgl. Abb. 11 D) eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin feststellbar war. In den Pax6-Norrin Mäusen konnte  $\beta$ -Catenin immunhistochemisch auch in den Kernen des Bereichs der inneren Körnerschicht lokalisiert werden (vgl. Abb. 11 D), der hauptsächlich die Nuklei der Amakrinzellen enthält (vgl. 1.2.1).

#### 4.1.3 Untersuchung des Phänotyps von Pax6-Norrin Mäusen

Um den Phänotyp der Pax6-Norrin 04 Mäuse charakterisieren zu können, wurden transgene Tiere im genetischen FVB/N Hintergrund mit CD-1 Wildtypmäusen ver-



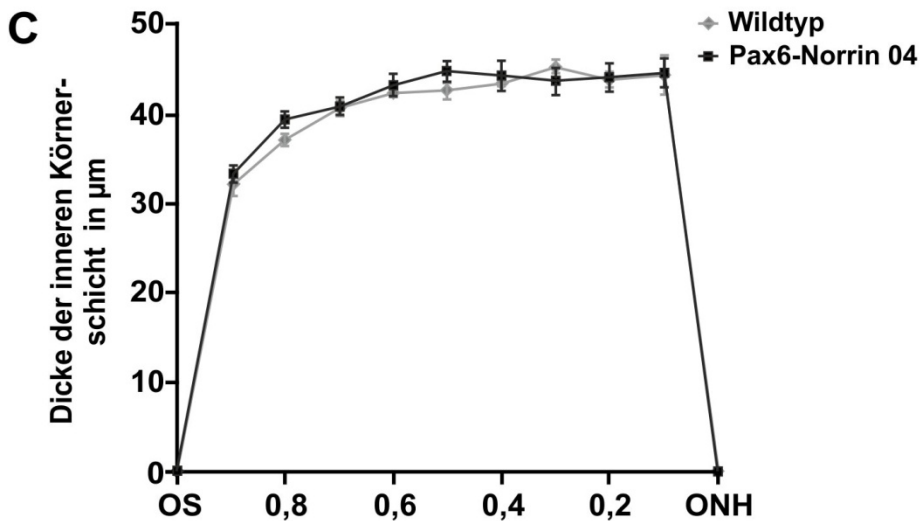
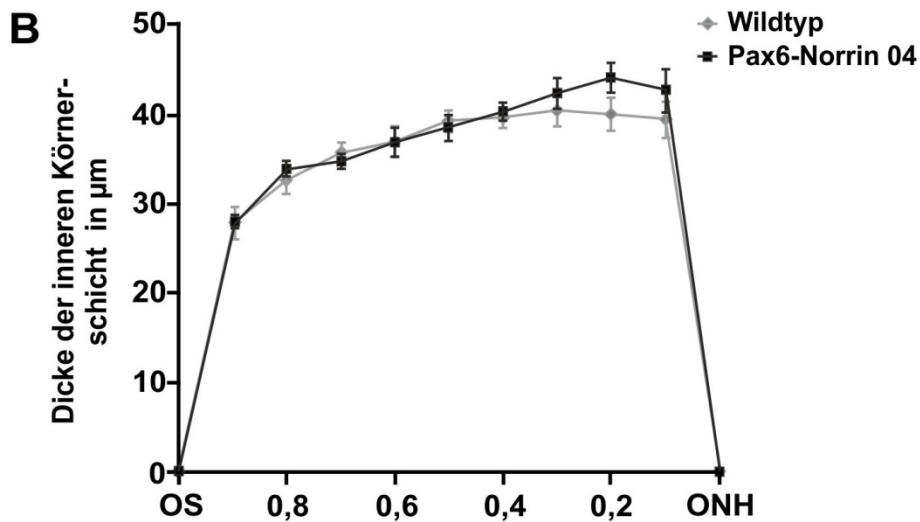
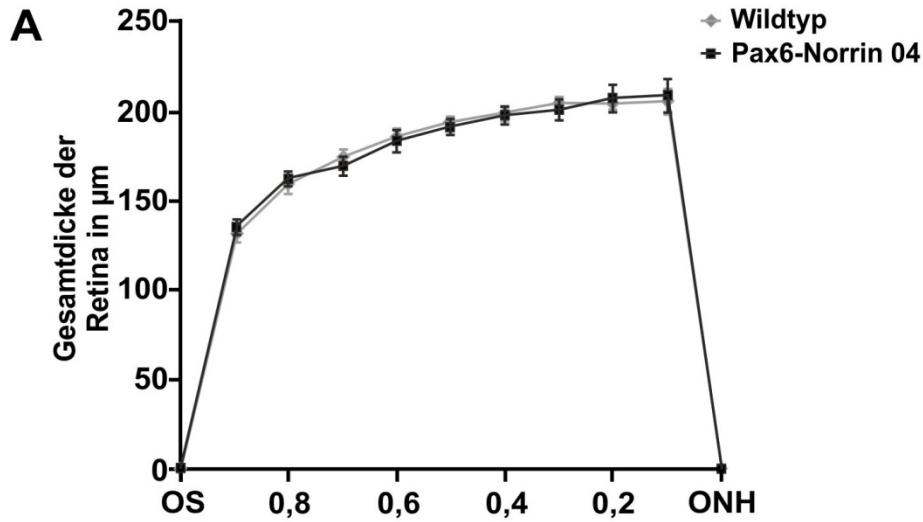
paart, um die autosomal rezessive retinale Degeneration (rd1), welche sich im homozygoten FVB/N Hintergrund entwickelt (Giménez & Montoliu 2001), zu vermeiden. In der F1-Generation wurden die Augen und *Nervi optici* von Pax6-Norrin 04 Mäusen und Wildtypgeschwistern nach 6 Wochen präpariert und in Epon eingebettet. In sagittalen Semidünnschnitten der gesamten Retina (vgl. Abb. 12) konnte lichtmikroskopisch kein Größenunterschied zwischen den Augen von transgenen (vgl. Abb. 12 B) und wildtypischen (vgl. Abb. 12 A) Mäusen festgestellt werden. Auch waren in beiden Vergleichsgruppen (vgl. Abb. 12), in der zentralen und peripheren Retina, die verschiedenen retinalen Schichten normal ausgebildet.



**Abb. 12: Lichtmikroskopie von Pax6-Norrin Mäusen**

A-D: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte durch die gesamte Retina (A, C) sowie daraus vergrößerte Detailaufnahmen (B, D) einer 6 Wochen alten Pax6-Norrin 04 Maus (C, D) im Vergleich zu einem Wildtypen (A, B) desselben Wurfs (F1-Generation aus Verpaarung von Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1 Wildtyp). Maßstabsbalken: A, C, 500 µm; B, D, 50 µm.

Zusätzlich wurde die Dicke der gesamten Retina (vgl. Abb. 13 A), der inneren Körnerschicht (INL, vgl. Abb. 13 B) sowie der äußeren Körnerschicht (ONL, vgl. Abb. 13 B) bestimmt.



**Abb. 13: Pax6-Norrin Mäuse zeigen keine Veränderung der retinalen Gesamtdicke, der INL und ONL.**

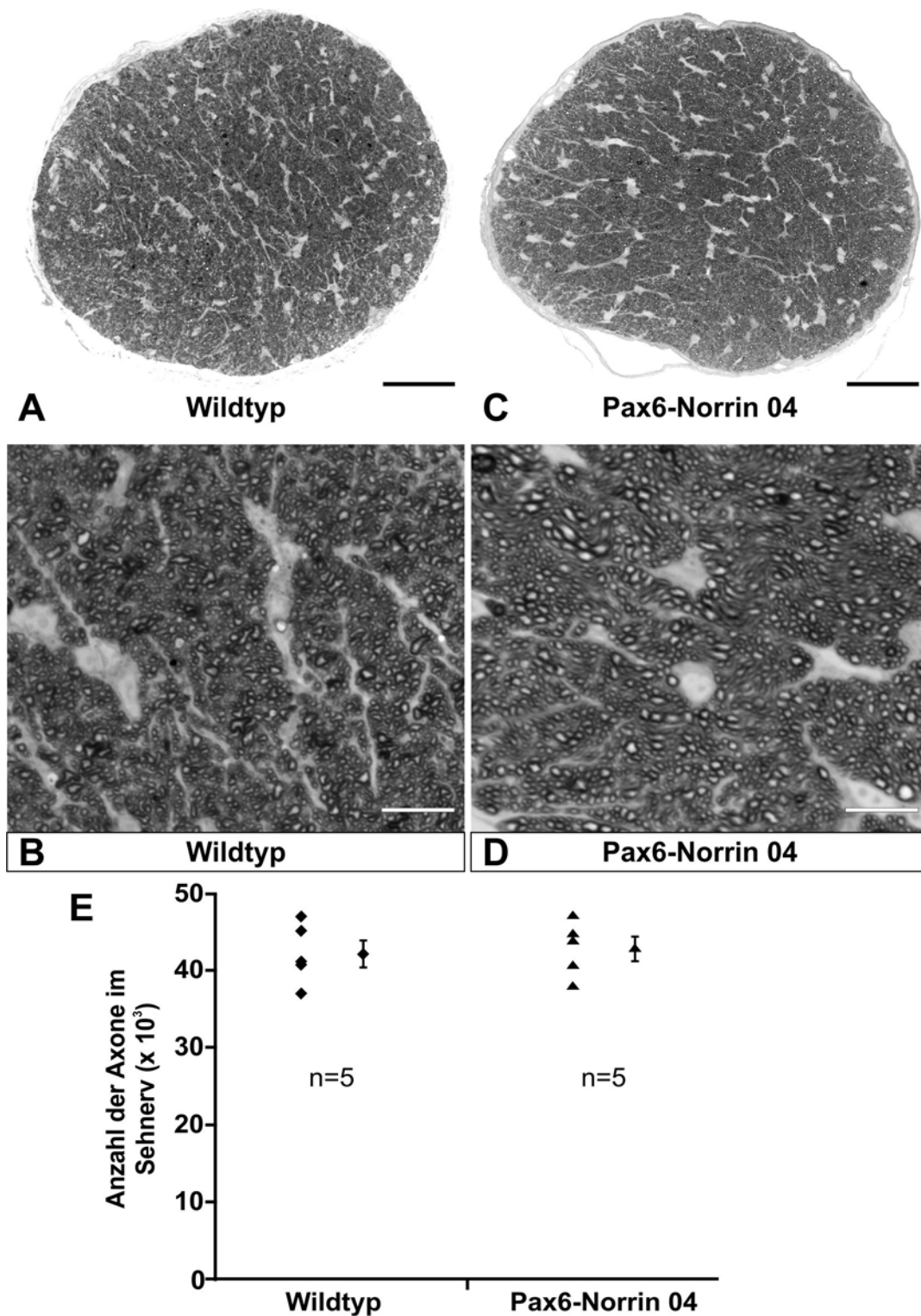
A-C: Quantitative Auswertung der gesamten Netzhautdicke (von der *Membrana limitans interna* bis einschließlich zum retinalen Pigmentepithel; A), der inneren Körnerschicht (INL; B) und der äußeren Körnerschicht (ONL; C) von 6 Wochen alten Pax6-Norrin 04 Mäusen bzw. Wildtyp-Wurfgeschwistern (F1-Generation aus Verpaarung von Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1). An sagittalen Semidünnschnitten wurden beide Zirkumferenzen der Retina, von der *Ora serrata* (OS) bis zum Sehnervenkopf (ONH) sowie vom ONH zur OS, jeweils in zehn gleiche Abschnitte aufgeteilt und die Dicke am Anfang sowie am Ende jedes Zehntels gemessen. Von den Dicken der entsprechenden Abschnitte beider Zirkumferenzen einer Retina wurde der Mittelwert berechnet (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 5).

Hierzu wurden die sagittalen Semidünnschnitte der gesamten Retina am Computer, zwischen *Ora serrata* und Sehnervenkopf in zehn gleiche Abschnitte eingeteilt und am Anfang und Ende jedes Segments die jeweilige Dicke bestimmt. Abb. 13 zeigt die Mittelwerte der Dickenmessung beider Zirkumferenzen. Bei der Messung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Transgenen bezüglich der Dicke der Retina, der INL und der ONL registriert werden.

Des Weiteren wurde an sagittalen Semidünnschnitten die Morphologie der Sehnerven untersucht. In transgenen (vgl. Abb. 14 C, D) wie auch in den wildtypischen (vgl. Abb. 14 A, B) Mäusen fanden sich normal entwickelte Sehnerven, mit dicht gepackten Axonen und wenig glialem Gewebe. Zur genaueren Analyse wurden die Axone in beiden Versuchsgruppen quantifiziert, indem die Axonzahl in 5 repräsentativen Quadraten eines am Computer eingeblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) ermittelt und auf die gesamte Fläche des jeweiligen Sehnervs hochgerechnet wurde. Wie Abb. 14 E zeigt, unterscheiden sich die Mittelwerte der erhobenen Axonzahlen, mit  $42293,5 \pm 1758,9$  für die Wildtypen und  $43008,8 \pm 1606,8$  für die Pax6-Norrin Mäuse, kaum. Dies lässt den Rückschluss zu, dass auch in der Netzhaut die Anzahl der retinalen Ganglienzellen in transgenen wie auch wildtypischen Kontrolltieren gleich ist.

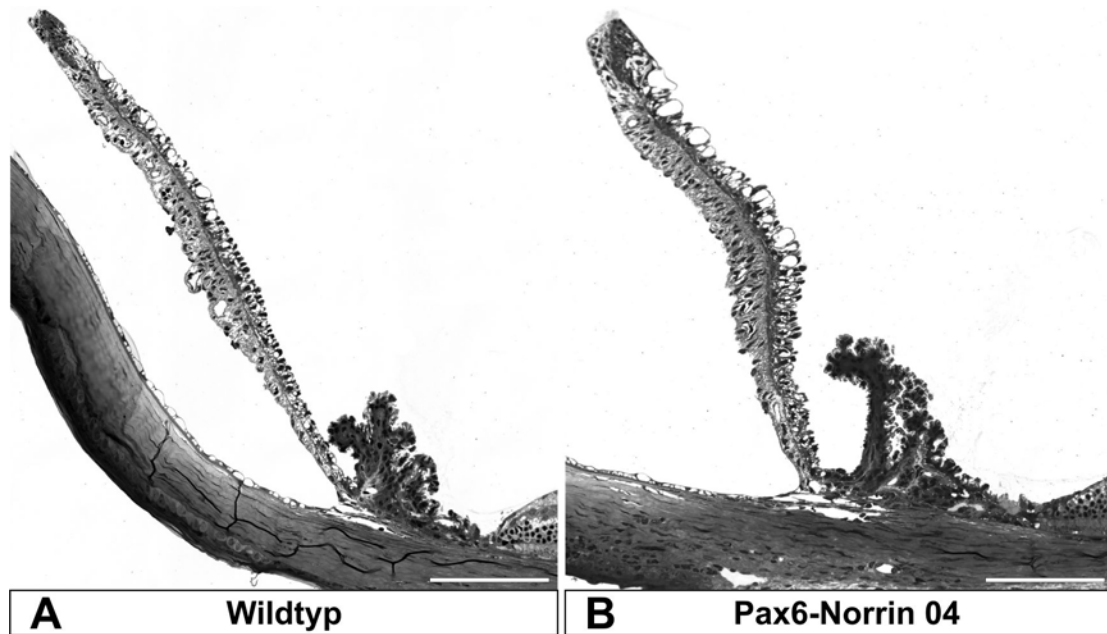
Die Pax6-Norrin 04 Mäuse sollten im weiteren Verlauf auch in den genetischen DBA/2J Hintergrund gekreuzt und analysiert werden. Bei diesem genetischen Hintergrund kommt es auf Grund von massiven Veränderungen im vorderen Augenabschnitt zur Schädigung retinaler Ganglienzellen (John *et al.* 1998). Daher wurde im Rahmen der Phänotypanalyse von Pax6-Norrin 04 Mäusen auch dieses Segment des Auges untersucht. In sagittalen Semidünnschnitten konnte sowohl in den transgenen Mäusen (vgl. Abb. 15 B) als auch bei den Wildtypwurfgeschwistern (vgl. Abb. 15 B) ein Ziliarkörper mit regulär ausgebildeten Fortsätzen und zweischichtigem Epithel registriert werden. Darüber hinaus zeigte auch die Iris beider Gruppen ein nor-

males Stroma und ein Epithel mit zwei Lagen. Der Kammerwinkel war bei beiden Versuchsgruppen offen und zeigte keine abnormen Veränderungen im Trabekelwerk und im Schlemmkanal. Wie schon bei den weiter oben genannten Untersuchungen zur Phänotypanalyse des Auges ergab sich somit auch im vorderen Augenabschnitt kein Unterschied zwischen Pax6-Norrin 04 Mäusen und Wildtypgeschwistern.



**Abb. 14: Pax6-Norrin Mäuse unterscheiden sich nicht in der Axonzahl im *Nervus opticus* von genetisch identischen Wildtyptieren.**

A-D: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte durch den *N. opticus* einer 6 Wochen alten Pax6-Norrin 04 Maus (C: Übersicht, D: Detail) bzw. einem Wildtypgeschwister (A: Übersicht, B: Detail) des gleichen Wurfes (F1-Generation aus Verpaarung von Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1). In der Morphologie des *N. opticus* beider Gruppen zeigen sich keine Unterschiede. Maßstabsbalken: A, C, 50 µm; B, D, 10 µm. E: Bestimmung der Axonzahl der Sehnerven, ermittelt durch Auszählung in 5 Quadraten (je 1600 µm<sup>2</sup>) eines digital eingblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) und Hochrechnung auf die Gesamtfläche des Sehnerven (Fläche begrenzt durch die *Pia mater*). Die Quantifizierung zeigt keine Unterschiede zwischen den Transgenen und den Wildtypen (Einzelwerte bzw. Mittelwert ± SEM).



**Abb. 15: Der vordere Augenabschnitt in Pax6-Norrin Mäusen ist normal ausgebildet.**

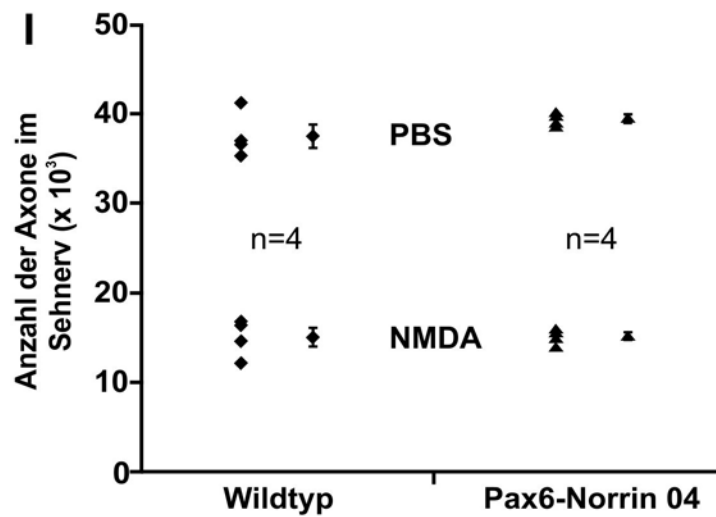
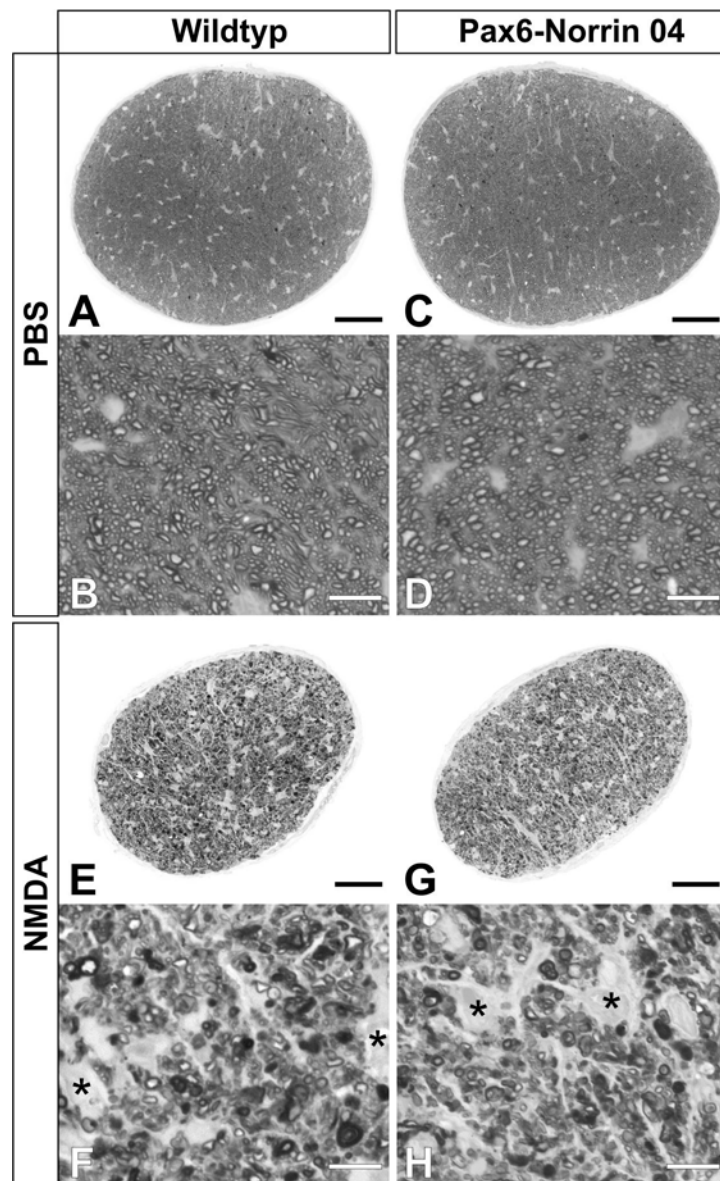
A, B: Exemplarische sagittale Semidünnschnitte des vorderen Augenabschnitts 6 Wochen nach der Geburt. Die Pax6-Norrin 04 Maus (A) zeigt keine strukturellen Veränderungen im Ziliarkörper, in der Iris, im Trabekelwerk und im Schlemmkanal, verglichen mit einem Wildtyp (B) desselben Wurfes (F1-Generation aus Verpaarung von Pax6-Norrin 04/FVB/N mit CD-1). Maßstabsbalken: 100 µm.

#### 4.1.4 Analyse von Pax6-Norrin Mäusen im NMDA-Schadensmodell

Die intravitreale Injektion von Norrin kann, bei einer NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schädigung (vgl. 1.3.1), das Überleben retinaler Ganglienzellen signifikant steigern (Seitz *et al.* 2010). Durch eine intravitreale NMDA-Injektion kommt es über die Aktivierung von NMDA-Rezeptor-Kanälen zu einem anhaltenden Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und schließlich zur Apoptose retinaler Ganglienzellen (Shen *et al.* 2006). NMDA-Rezeptoren sind in der Retina in den Ganglien- und den Amakrinzellen vorhanden (Slaughter 2010).

Um zu testen, ob auch die Überexpression von Norrin in der inneren Retina von Pax6-Norrin 04 Mäusen protektiv auf retinale Ganglienzellen bei NMDA-induzierter

Schädigung wirkt, wurden die transgenen Tiere zusammen mit ihren Wildtypgeschwistertieren im NMDA-Schadensmodell untersucht.



**Abb. 16: Pax6-Norrin Mäuse sind nicht vor NMDA-induziertem RGC-Axonverlust geschützt.**

A-H: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte durch den Sehnerv, 3 Wochen nach intravitrealer Injektion von 3  $\mu$ l PBS (A, C: Übersicht; B, D: Detail) bzw. 3  $\mu$ l 10 mM NMDA (Injektion in das Partnerauge; E, G: Übersicht; B, D: Detail) in Pax6-Norrin 04 Mäuse (C, D, G, H) oder deren Wildtypwurfgeschwister (A, B; E, F). Für die Injektion wurde die adulte F1-Generation aus der Verpaarung einer Pax6-Norrin 04/FVN/N Maus mit einer CD-1 Wildtypmaus eingesetzt. Die Morphologie der *Nn. optici* beider Versuchsgruppen weist in der lichtmikroskopischen Betrachtung nach PBS-Injektion (A-D) keine Unterschiede auf. In den NMDA-injizierten Sehnerven (E-H) ist ein ausgeprägter Axonverlust und die Bildung glialer Narben (\*) festzustellen. Auch hierbei unterscheiden sich beide Gruppen nicht. Maßstabsbalken: A, C, E, G, 50  $\mu$ m; B, D, F, H, 10  $\mu$ m. I: Quantifizierung der Axonzahl der Sehnerven nach PBS- bzw. NMDA-Injektion. Die *Nn. optici* wurden hierfür komplett ausgezählt. Die transgenen Mäuse zeigen wie die Wildtypen nach NMDA-Injektion eine drastische Abnahme der Axonzahl von retinalen Ganglienzellen (RGC), im Vergleich zu PBS-injizierten Sehnerven (Einzelwerte bzw. Mittelwert  $\pm$  SEM).

Hierfür wurden 5 Wochen alte Tiere, aus der F1-Generation einer Verpaarung einer transgenen Maus im gene-tischen FVB/N Hintergrund mit einem CD-1 WildtypTier (vgl. 4.1.3), verwendet. Wildtypen und Transgene wurden intravitreal 3  $\mu$ l NMDA, in einer Konzentration von 10 mM, injiziert. In den Glaskörper des jeweiligen Partnerauges wurden 3  $\mu$ l PBS gespritzt. Drei Wochen nach intravitrealer Injektion wurden die *Nervi optici* präpariert und einer Eponeinbettung zugeführt.

Anhand von sagittalen Semidünnschnitten wurde anschließend die Morphologie der Sehnerven untersucht. Die *Nn. optici* der PBS-injizierten Kontrollaugen beider Vergleichsgruppen erschienen lichtmikroskopisch unversehrt, wiesen dicht gepackte Axone und ein geringes Maß an glialem Gewebe auf (vgl. Abb. 16 A-D). In den optischen Nerven der Augen mit NMDA-Behandlung (vgl. Abb. 16 E-H), konnte hingegen in beiden Versuchsgruppen ein gravierender Axonverlust und größere Areale mit glialer Vernarbung konstatiert werden. Zusätzlich waren auch etliche Axone mit sehr intensiver Färbung ihrer Myelinscheiden zu erkennen, was ein weiterer Indikator für eine Degeneration der Axone von retinalen Ganglienzellen bzw. deren Myelinscheide ist (Seitz *et al.* 2010). Wie schon die Sehnerven der PBS-injizierten Augen, zeigten auch die Sehnerven der NMDA-behandelten Augen keinen augenfälligen Unterschied zwischen den transgenen Pax6-Norrin 04 Mäusen und den Wildtypwurfgeschwistern. Um die Sehnerven beider Gruppen genauer zu analysieren, wurden die Axone in den *Nn. optici* komplett ausgezählt (vgl. Abb. 16 E). Die Quantifizierung ergab bei den PBS-injizierten Mäusen, mit im Mittel  $37502,8 \pm 1275,1$  Axonen in den wildtypischen und  $39457,5 \pm 388,2$  Axonen in den transgenen Sehnerven, eine nahezu identische Zahl in beiden Gruppen. Auch in den NMDA-geschädigten Sehnerven war die Axonzahl mit einem Mittelwert von  $15011,25 \pm 1061,6$  für die Wildtypen und  $15190,5 \pm 383,3$  in den Transgenen beinahe gleich. Somit erbrachten die Analysen

keinen Hinweis, auf eine protektive Wirkung der transgenen Norrin-Überexpression in der inneren Netzhaut von Pax6-Norrin 04 Mäusen gegen einen NMDA-induzierten exzitotoxischen Schaden retinaler Ganglienzellen.

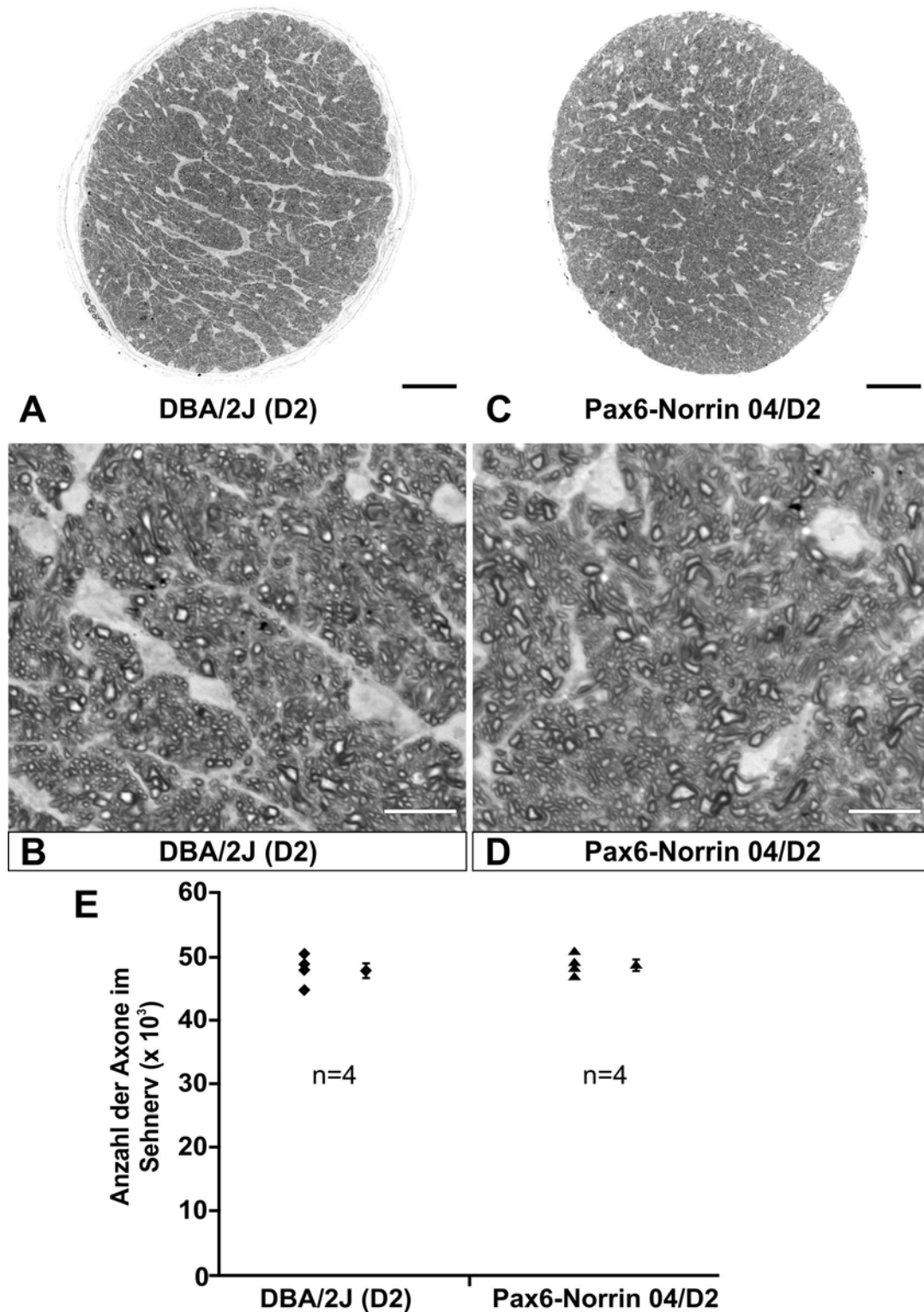
#### **4.1.5 Pax6-Norrin Mäuse im genetischen DBA/2J Hintergrund**

In Pax6-Norrin 04 Mäusen sollten, neben der akuten Schädigung retinaler Ganglienzellen im NMDA-Schadensmodell, auch die Auswirkung eines chronischen Verlusts retinaler Ganglienzellen untersucht werden. Hierfür wurden die Pax6-Norrin 04 Mäuse durch Verpaarung vollständig aus dem genetischen FVB/N Hintergrund in den DBA/2J Hintergrund überführt. Dazu wurden Pax6-Norrin Mäuse 7x mit DBA/2J Wildtypmäusen rückgekreuzt. DBA/2J Wildtypmäuse (vgl. 1.3.2) entwickeln bekanntermaßen ein Sekundärglaukom, bei dem es zu einer chronisch progredienten Degeneration retinaler Ganglienzellen kommt (Libby *et al.* 2005a).

##### **4.1.5.1 Analyse der Sehnerven vor Entwicklung eines Glaukoms**

Erste glaukomatöse Veränderungen im Sehnerv sind in DBA/2J Wildtypen erst nach ca. 8 Monaten festzustellen (Libby *et al.* 2005a). Die *Nn. optici* von Pax6-Norrin 04 Mäusen im DBA/2J (D2) Hintergrund und ihren Wildtypgeschwistern wurden bereits im Alter von acht Wochen analysiert, um einen möglichen Einfluss der Norrin-Überexpression auf die normale Entwicklung der retinalen Ganglienzellen und des Sehnerven im DBA/2J Hintergrund zu überprüfen. Dazu wurden Sehnerven entnommen, eingebettet und sagittale Eponschnitte angefertigt. Die *Nervi optici* beider Gruppen erschienen in der lichtmikroskopischen Betrachtung unauffällig. Beide Vergleichsgruppen zeigten einen geringen Anteil an glialem Gewebe und dicht beisammen stehende Axone in großer Anzahl (vgl. 4.1.5.1 A-D). Die Axonzahl wurde in den Pax6-Norrin Mäusen und den wildtypischen Kontrolltieren genauer analysiert. Hierzu wurde sie in 5 repräsentativen Quadraten eines am Computer eingeblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) ermittelt und auf die gesamte Fläche des jeweiligen Sehnervs hochgerechnet. Wie Abb. 17 E zeigt, sind die Mittelwerte der hochgerechneten Axonzahlen, mit  $47902,7 \pm 1174,9$  für die DBA/2J Wildtypen und  $48773,8 \pm 829,1$  für die Pax6-Norrin/D2 Mäuse, nahezu identisch.



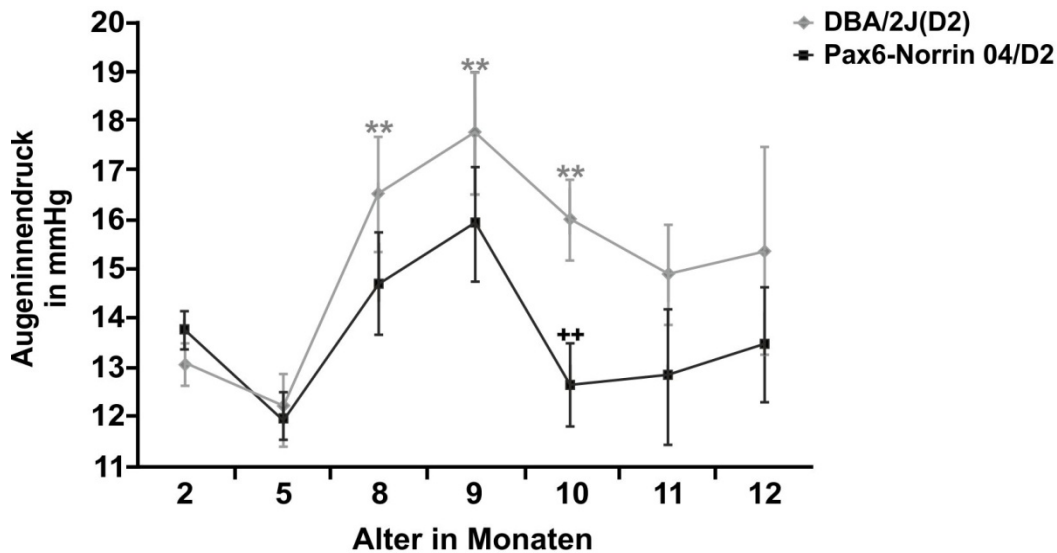


**Abb. 17: Die Axonzahl im *N. opticus* von Pax6-Norrin/DBA/2J Mäusen ist im Alter von 8 Wochen identisch mit der von Wildtypen.**

A-D: Exemplarische sagittale Semidünnschnitte durch den *N. opticus* einer 8 Wochen alten Pax6-Norrin 04/DBA/2J Maus (C: Übersicht, D: Detail) bzw. einem DBA/2J (D2) Wildtypgeschwister (A: Übersicht, B: Detail). In der lichtmikroskopischen Betrachtung zeigen sich keine Unterschiede in der Morphologie des *Nervus opticus* beider Vergleichsgruppen. Maßstabsbalken: A, C, 50  $\mu\text{m}$ ; B, D, 10  $\mu\text{m}$ . E: Quantifizierung der Axonzahl der Sehnerven, ermittelt durch Auszählung in 5 Quadraten (mit einer Fläche von jeweils 1600  $\mu\text{m}^2$ ) eines digital eingblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) und Hochrechnung auf die Gesamtfläche des Sehnerven (Fläche begrenzt durch die *Pia mater*). Die Bestimmung der Axonzahl zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Einzelwerte bzw. Mittelwerte  $\pm$  SEM).

#### 4.1.5.2 Intraokulare Druckveränderungen

DBA/2J Wildtypmäuse zeigen meist ab einem Alter von 8 bis 9 Monaten einen deutlichen Anstieg des intraokularen Drucks (Libby *et al.* 2005a). In dessen Folge kommt es zu einer Degeneration retinaler Ganglienzellen (Libby *et al.* 2005a).



**Abb. 18: Pax6-Norrin/D2 Mäuse zeigen einen geringeren IOD als wildtypische Kontrolltiere.**

Applanationstonometrische Messung des intraokularen Drucks (IOD) an Pax6-Norrin 04/DBA/2J Mäusen bzw. an deren Wildtypgeschwistern im Alter von 2, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten (Mittelwert  $\pm$  SEM; 2, 5 und 8 Monate:  $n \geq 24$ , 9 Monate:  $n \geq 16$ , 10 Monate:  $n \geq 14$ , 11 Monate:  $n \geq 15$ , 12 Monate:  $n \geq 8$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Wildtypen nach 2 Monaten und \*\*  $p < 0,01$  Vergleich zwischen Wildtypen und Transgenen nach 10 Monaten).

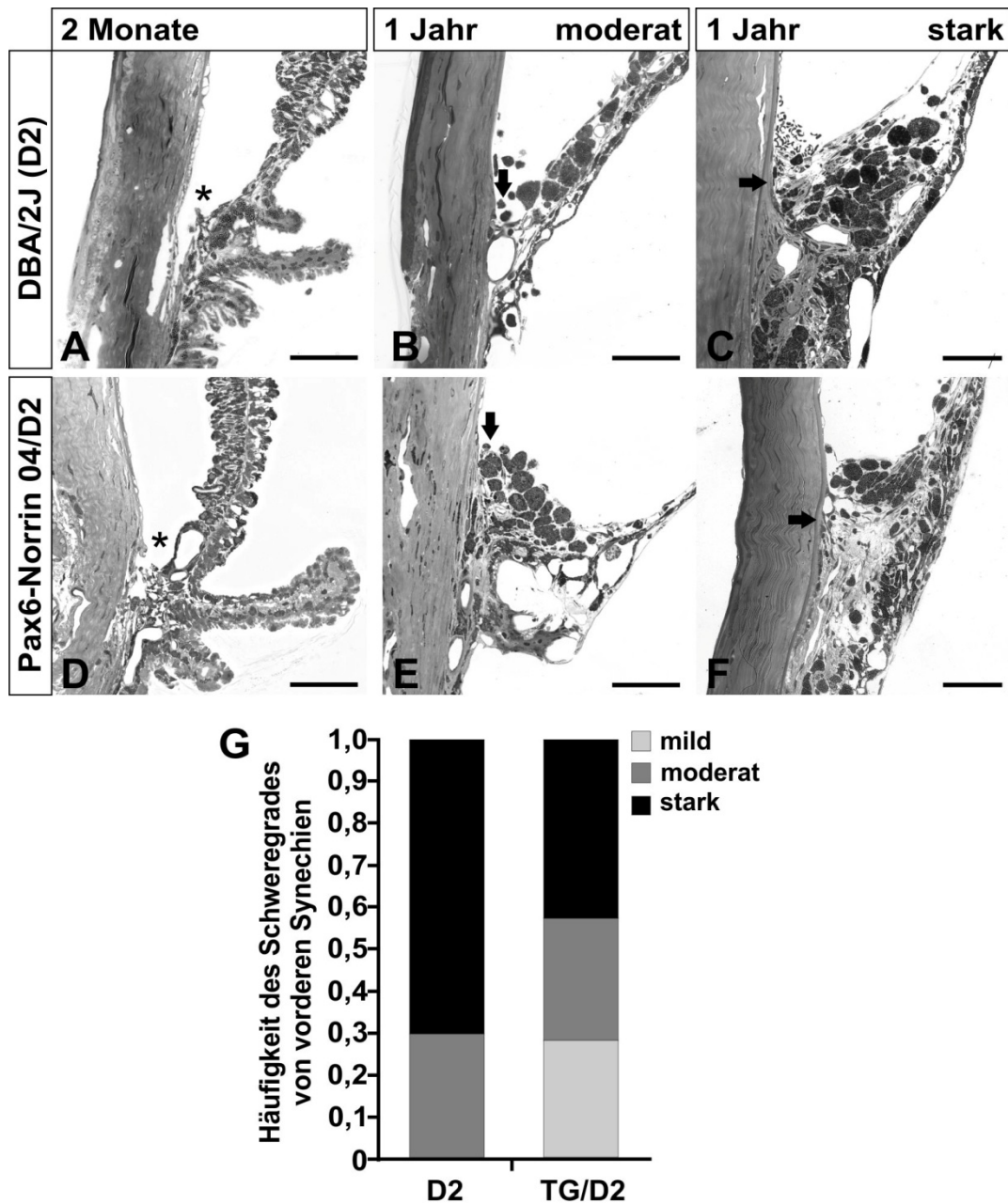
Pax6-Norrin Mäuse im DBA/2J Hintergrund wurden im Zeitraum eines Jahres im Hinblick auf Veränderungen ihres intraokularen Drucks (IOD) untersucht. Durch den Vergleich mit wildtypischen Geschwistern sollten mögliche Druckunterschiede, als Folge der Norrin-Überexpression, erkannt werden. Mittels Applanationstonometrie wurde der Augeninnendruck im Alter von 2, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten gemessen (vgl. Abb. 18). In Pax6-Norrin/D2 Mäusen wurde in diesem Zeitraum kein signifikanter Druckanstieg im Vergleich zum Ausgangswert im Alter von 2 Monaten beobachtet. Der höchste intraokulare Druck wurde in den transgenen Tieren nach 9 Monaten ermittelt und lag bei  $15,9 \pm 1,2$  mmHg. Verglichen zum Ausgangswert von  $13,8 \pm 0,4$  mmHg nach 2 Monaten, konnte nach 9 Monaten nur ein geringer Anstieg ( $p < 0,1$ ) gefunden werden. In den wildtypischen Geschwistertieren, die als Kontrollen dienten, war der IOD, im Vergleich zum 2 Monatswert von  $13,1 \pm 0,4$  mmHg, nach 8 Monaten ( $16,5 \pm 1,2$  mmHg), 9 Monaten ( $17,8 \pm 1,2$  mmHg) und 10 Monaten ( $16 \pm$

0,8 mmHg) jeweils hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht. Die transgenen Mäuse hatten nach 10 Monaten mit  $12,7 \pm 0,8$  mmHg einen deutlich geringeren IOD als die Kontrolltiere. Dieser Druckunterschied zwischen den beiden Gruppen war ebenfalls hoch signifikant ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.5.3 Veränderungen im vorderen Augenabschnitt und der Retina

Mäuse des DBA/2J Stammes tragen Mutationen in den Genen *Tyrp1* und *Gpnmb*, welche zu Veränderungen im vorderen Augenabschnitt führen (Anderson *et al.* 2002; Chang *et al.* 1999). Mit zunehmendem Alter kommt es vor allem zur Ausbildung von Pigmentepithelatrophien der Iris, vorderen Synechien sowie Atrophien des Ziliarkörpers, wobei die pathologischen Veränderungen in unterschiedlichen Schweregraden auftreten (John *et al.* 1998). Die transgenen Pax6-Norrin 04/D2 Mäuse und ihre Wildtypgeschwister wurden auf die genannten Anomalien im vorderen Augensegment hin analysiert. Hierzu wurden die Augen von 2 sowie 12 Monate alten Tieren enukleiert und in Epon eingebettet. Die Untersuchung der Morphologie des vorderen Augenabschnitts erfolgte lichtmikroskopisch an sagittalen Semidünnschnitten. 12 Monate alte Mäuse wurden zusätzlich semiquantitativ daraufhin analysiert, ob und wenn ja in welchem Schweregrad (zu den Bewertungskriterien vgl. 3.3.5.2) vordere Synechien, Pigmentepithelatrophien der Iris und Atrophien des Ziliarkörpers vorlagen.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung des Kammerwinkels im Alter von 2 Monaten konnte sowohl in den Transgenen als auch in den Wildtypen ein normal entwickelter, geöffneter Kammerwinkel ohne Auffälligkeiten im Trabekelwerk und Schlemmkanal festgestellt werden (vgl. Abb. 19 A, D). Die semiquantitative Untersuchung (vgl. Abb. 19 G) zeigte in ca. 30 % der Augen von beiden Vergleichsgruppen nach einem Jahr moderate vordere Synechien (vgl. Abb. 19 B, E), durch die der Kammerwinkel verlegt war. Auch konnten bei diesen Augen mit Pigment gefüllte Vesikel auf der Iriswurzel lokalisiert werden. 70 % der wildtypischen Proben hatten starke vordere Synechien (vgl. Abb. 19 C), mit einer Anheftung der Iris an die Cornea auf breiter Fläche. Die Augen der Pax6-Norrin/D2 Mäuse wiesen nur zu ca. 40 % starke vordere Synechien (vgl. Abb. 19 F) auf. In den anderen ungefähr 30 % der transgenen Proben war nur eine milde Form der vorderen Synechie festzustellen. Bei den Wildtypen waren vordere Synechien milder Ausprägung, mit einer teilweisen Bedeckung des Trabekelwerks, nicht zu finden.



**Abb. 19: In Pax6-Norrin/D2 Mäusen und D2 Geschwistern bilden sich vordere Synechien aus.**

A-F: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte des Kammerwinkels von zwei Monate bzw. ein Jahr alten Pax6-Norrin 04/D2 Mäusen (D-F) und DBA/2J Geschwistern (A-C). Zwei Monate alte Mäuse beider Vergleichsgruppen zeigen einen normal entwickelten, geöffneten Kammerwinkel (A, D, \*). Nach einem Jahr weisen sowohl die DBA/2J Wildtypen als auch die transgenen Tiere im gleichen Umfang (vgl. G) eine moderate vordere Synechie (B, E) auf, bei welcher der Kammerwinkel verlegt ist (Pfeile) und Pigment gefüllte Vesikel auf der Irisbasis auszumachen sind. Die Mehrheit der D2 Mäuse und im geringeren Maße auch die Pax6-Norrin 04/D2 Mäuse (vgl. G) bilden eine starke vordere Synechie (C, F) aus, die nicht nur den Kammerwinkel verschließt, sondern bei der es auch auf breiter Fläche zur Anheftung der Iris an die Cornea kommt (Pfeile). Maßstabsbalken: A-F, 50  $\mu$ m. G: Untersuchung der Häufigkeit der verschiedenen Schweregrade (mild: Synechie bedeckt nur einen Teil des Trabekelwerks; moderat, stark: siehe oben) vorderer Synechien in beiden Vergleichsgruppen ( $n \geq 10$ ). Die semiquantitative Analyse des Kammerwinkels wurde in Anlehnung an John *et al.* durchgeführt (John *et al.* 1998).

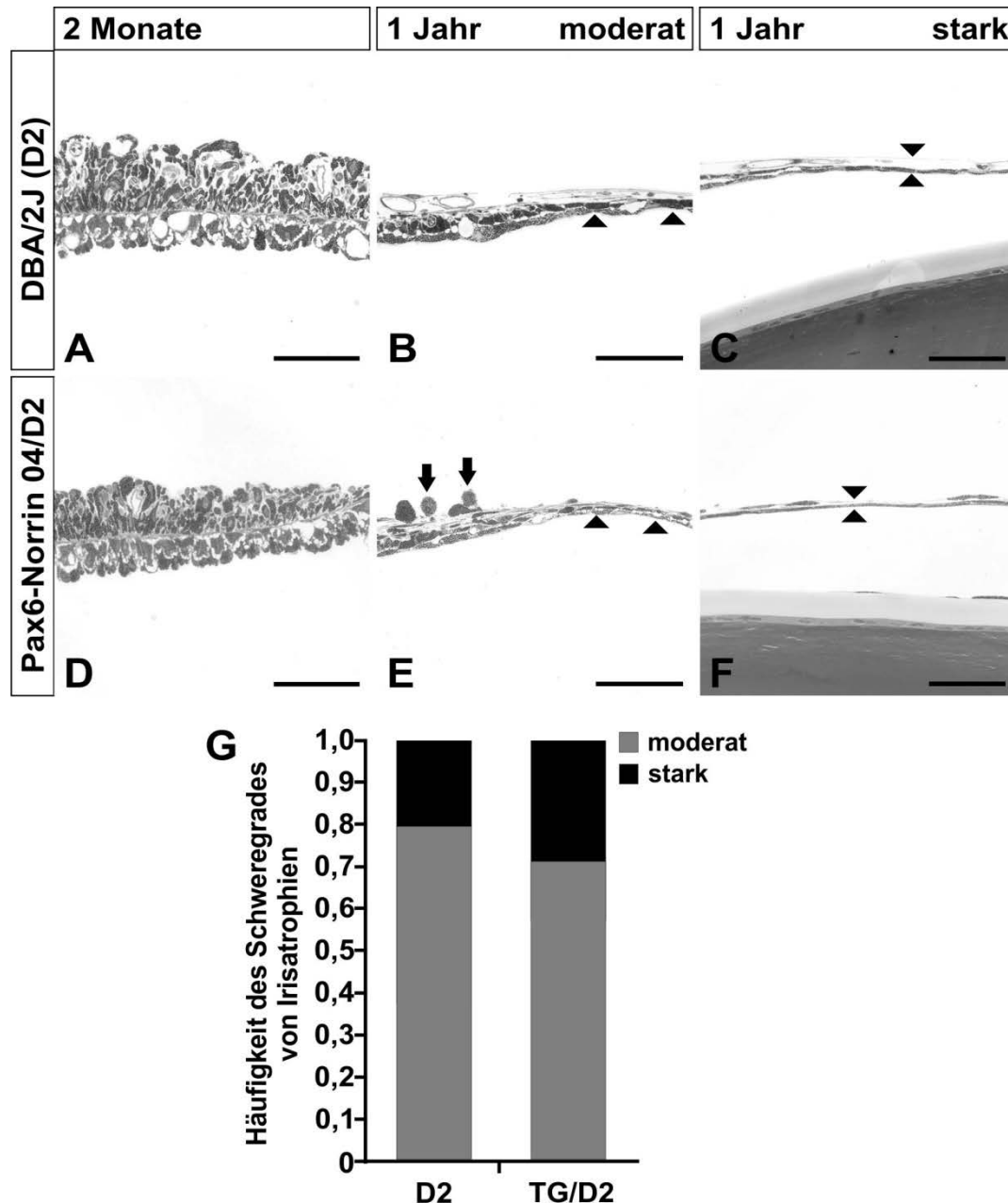
Die lichtmikroskopische Betrachtung zeigte in 2 Monate alten Pax6-Norrin/D2 Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren eine unauffällige Iris, mit normal entwickeltem Stroma und zweischichtigem Pigmentepithel (vgl. Abb. 20 A, D). Die semiquantitative Untersuchung von 12 Monate alten Tieren (vgl. Abb. 20 G) erbrachte in 80 % der wildtypischen bzw. ca. 70% der transgenen Augen eine moderate Pigmentepithelatrophie der Iris. Diese moderate Atrophie der Iris ist charakterisiert durch ein abgeflachtes Stroma und die Reduzierung des zweischichtigen Pigmentepithels auf eine ausgedünnte Schicht (vgl. Abb. 20 B, E). Bei einer Minderheit der Augen beider Gruppen, bei 20 % der Kontrollen und ca. 30 % der Transgenen, fand sich eine starke Pigmentepithelatrophie der Iris. Hierbei waren Stroma und Pigmentepithel der Iris fadenförmig ausgedünnt (vgl. Abb. 20 C, F).

Der Ziliarkörper zeigte im Alter von 2 Monaten in Pax6-Norrin/D2 Tieren und Wildtypgeschwistern normal ausgebildete Ziliarfortsätze mit zweischichtigem Epithel (vgl. Abb. 21 A, D). Im Rahmen der semiquantitativen Untersuchung (vgl. Abb. 21 G) zeigte sich nach einem Jahr ein gesunder Ziliarkörper noch bei 30 % der wildtypischen und bei ca. 20 % der transgenen Augen. Eine milde Form der Ziliarkörperatrophie, die durch verkürzte Ziliarfortsätze mit unveränderten Epithelschichten gekennzeichnet ist, fand sich hingegen bei 10% der wildtypischen Kontrollen und ca. 15 % der Pax6-Norrin/D2 Augen. Atrophierte Ziliarfortsätze mit dünneren Epithellagen sind charakteristisch für die moderate Ziliarkörperatrophie (vgl. Abb. 21 B, E). Diese konnte in ca. 30 % aller Augen beider Versuchsgruppen beobachtet werden. Zusätzlich ergab die Analyse in 30 % der wildtypischen und ca. 35 % der transgenen Proben eine starke Atrophie des Ziliarkörpers. Bei diesem Schweregrad waren die Ziliarfortsätze (vgl. Abb. 21 C, F) stark reduziert und hatten atrophierte Epithelschichten.

Zusätzlich zu den Veränderungen im vorderen Augenabschnitt konnten an sagittalen Semidünnschnitten der Retina, bei ca. 70 % (n = 14) der transgenen Augen nach einem Jahr und 80 % (n = 10) der wildtypischen Kontrollen, lokale Invasionen von Zellen aus der äußeren Körnerschicht in den subretinalen Spalt festgestellt werden (vgl. Abb. 22 C, F). Die zentrale und periphere Retina beider Vergleichsgruppen wies jedoch größtenteils eine normale Schichtung auf (vgl. Abb. 22 A, B, D, E).

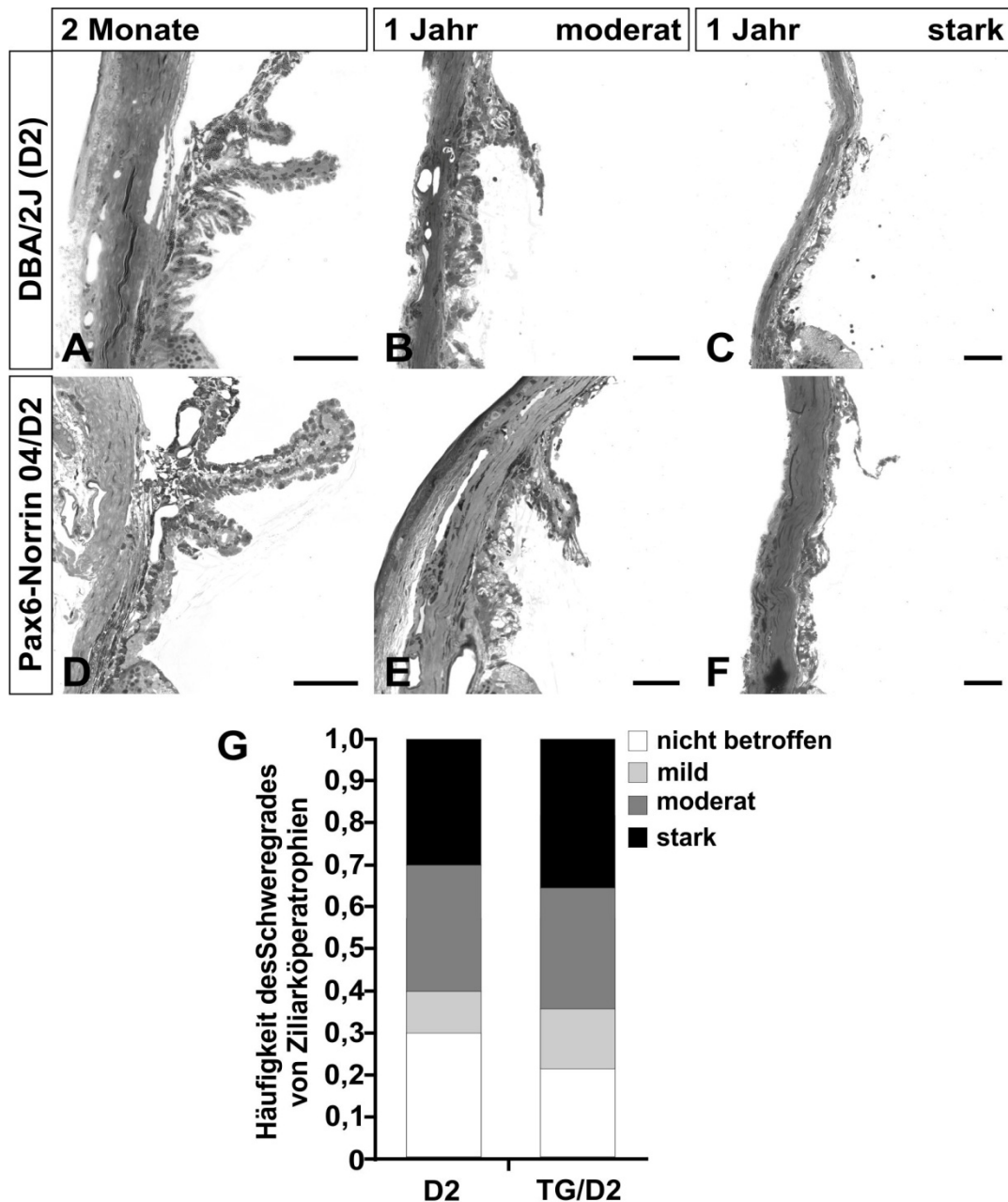
Sowohl die Anomalien in der Netzhaut als auch die Veränderungen im vorderen Augenabschnitt traten nicht regelmäßig in beiden Augen eines Tieres gleichzeitig auf.

Auch unterschieden diese sich im vorderen Augensegment zum Teil hinsichtlich des auftretenden Schadensniveaus.



**Abb. 20: Pigmentepithelatrophie der Iris in Pax6-Norrin/D2 Mäusen und D2 Wurfgeschwistern.**

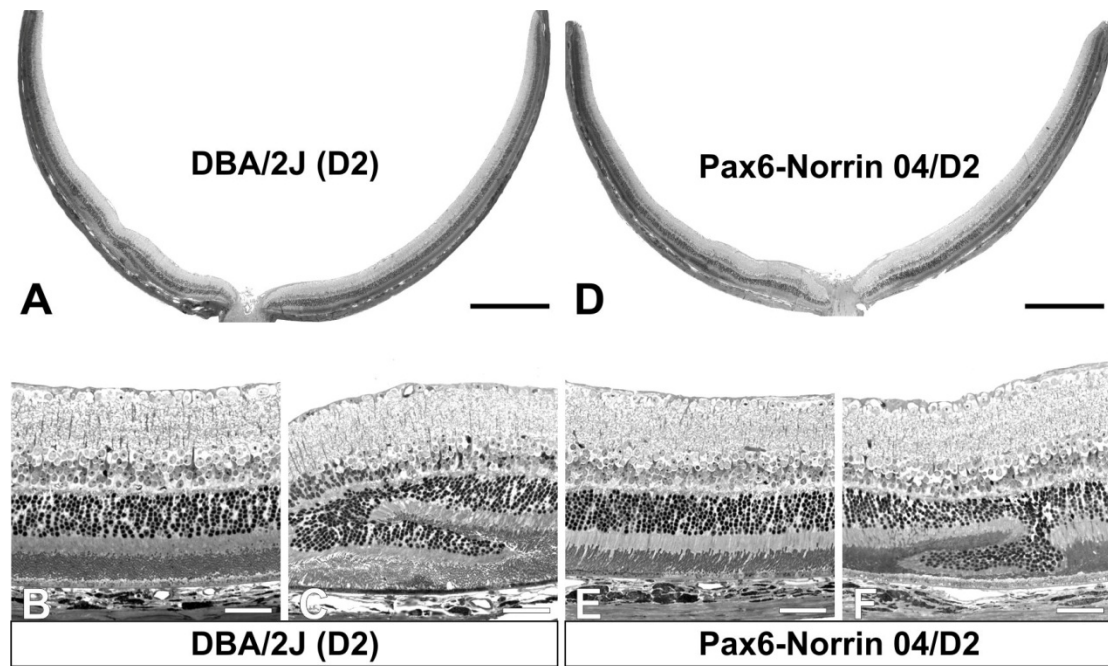
A-F: Exemplarische sagittale Semidünnschnitte der Iris von zwei Monate bzw. ein Jahr alten Pax6-Norrin 04/D2 Mäusen (D-F) und DBA/2J Geschwistern (A-C). Im Alter von zwei Monaten zeigen beide Versuchsgruppen eine Iris mit normal entwickeltem Irisstroma und zweischichtigem Epithel (A, D). Nach einem Jahr weisen sowohl die Wildtypen als auch die transgenen Mäuse mehrheitlich (vgl. G) eine moderate Pigmentepithelatrophie der Iris (B, E) auf, bei der das Stroma deutlich schmäler erscheint und statt eines zweischichtigen Epithels nur eine flache Pigmentepithelschicht (Pfeilspitzen) verbleibt. Zum Teil sind hierbei Pigment gefüllte Vesikel der Iris aufgelagert (E, Pfeile). Ein kleinerer Teil (vgl. G) der Mäuse beider Versuchsgruppen entwickeln eine starke Pigmentepithelatrophie der Iris (C, F), bei der das Stroma und das zweischichtige Pigmentepithel soweit ausgedünnt sind, dass die Iris fadenförmig wirkt (doppelte Pfeilspitzen). Maßstabsbalken: A-F, 50  $\mu$ m. G: Untersuchung der Häufigkeit der verschiedenen Schweregrade (siehe oben) der Pigmentepithelatrophie der Iris in beiden Versuchsgruppen (n  $\geq$  10). Die semiquantitative Analyse der Irisveränderungen wurde in Anlehnung an John *et al.* durchgeführt (John *et al.* 1998).



**Abb. 21: Atrophie des Ziliarkörpers in Pax6-Norrin/D2 Mäusen und DBA/2J Geschwistern.**

A-F: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte des Ziliarkörpers von zwei Monate bzw. ein Jahr alten Pax6-Norrin 04/D2 Mäusen (D-F) und DBA/2J Geschwistern (A-C). Im Alter von zwei Monaten zeigen beide Gruppen einen Ziliarkörper mit normal ausgeprägten Ziliarfortsätzen mit zweischichtigem Epithel (A, D). Nach einem Jahr finden sich bei den Wildtypen aber auch bei den Transgenen vermehrt (vgl. G) eine moderate (B, E) oder starke (C, F) Atrophie des Ziliarkörpers (Definition moderat bzw. stark: vgl. G) Maßstabsbalken: A-F, 50 µm. G: Ermittlung der Häufigkeit der verschiedenen Schweregrade der Ziliarkörperatrophie in beiden Versuchsgruppen (nicht betroffen; mild: Ziliarfortsätze sind verkürzt, das zweischichtige Epithel erscheint normal; moderat: atrophisierte Ziliarfortsätze mit schwächer ausgeprägtem zweischichtigem Epithel; stark: stark reduzierte Ziliarfortsätze mit atrophisierten Epithellagen; n ≥ 10). Die semiquantitative Analyse des Ziliarkörpers wurde in Anlehnung an John *et al.* durchgeführt (John *et al.* 1998).





**Abb. 22: Pax6-Norrin/D2-Mäuse und D2 wildtypische Kontrolltiere zeigen teilweise eine Invasion von Zellen aus der äußeren Körnerschicht in den subretinalen Spalt.**

A-D: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte durch die gesamte Retina (A, D) sowie daraus vergrößerte Detailaufnahmen (B, C, E, F) einer ein Jahr alten Pax6-Norrin 04/DBA/2J Maus (D, E, F) im Vergleich zu einem DBA/2J Geschwistertier (A, B; C). Die Retinae beider Versuchsgruppen zeigen mitunter eine lokale Invasion von Zellen aus der äußeren Körnerschicht in den subretinalen Spalt (C, F), weisen aber größtenteils eine normale Schichtung (B, E) auf. Maßstabsbalken: A, D, 500  $\mu\text{m}$ ; B, C, E, F, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.5.4 Schädigung der Sehnerven im experimentellen Glaukom

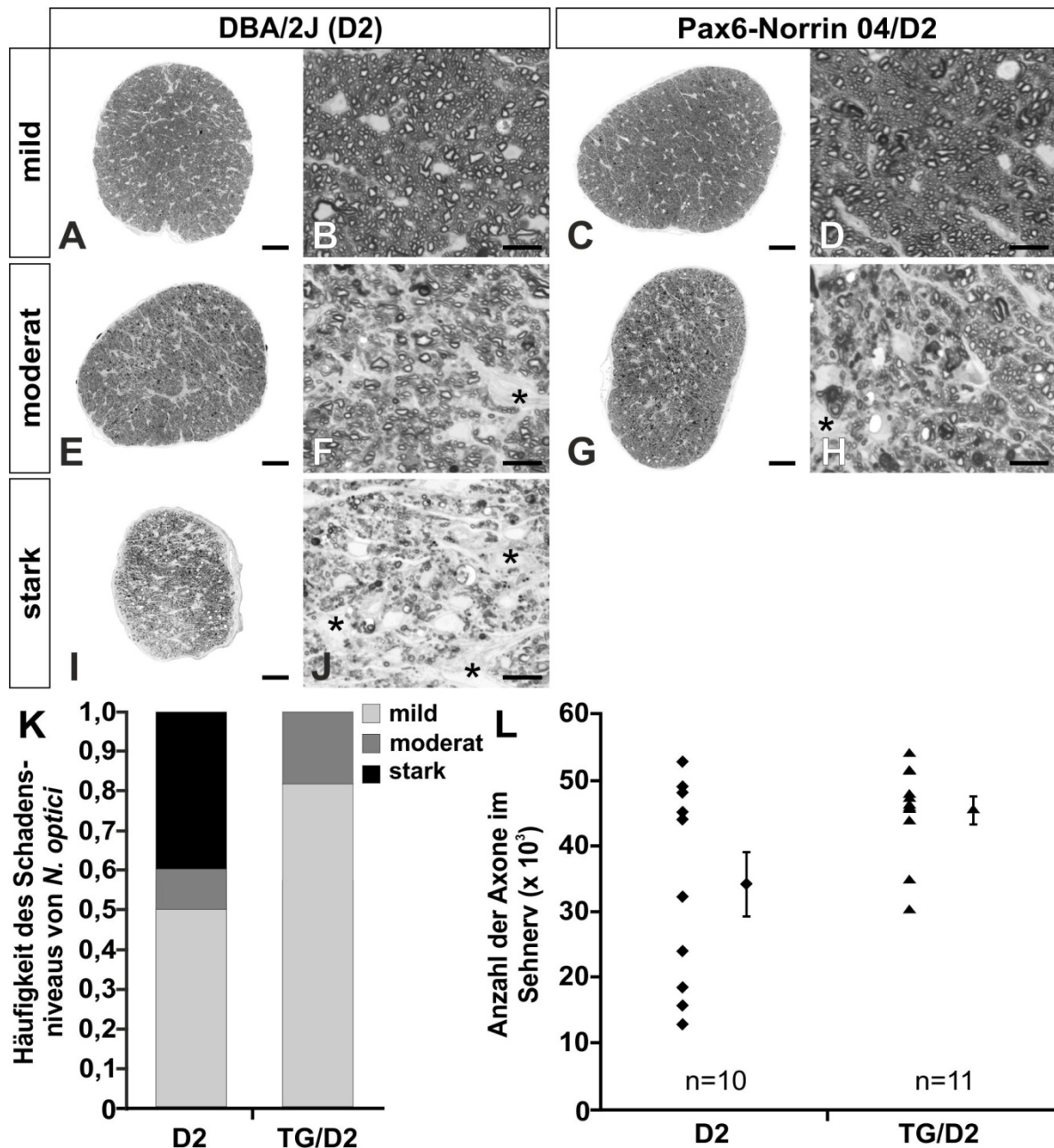
Wildtypische DBA/2J Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter ein Sekundärglaukom, wobei es zum Verlust retinaler Ganglienzellen und letztlich zu degenerativen Veränderungen des *N. opticus* kommt (Libby *et al.* 2005a). Man unterscheidet gängigerweise zwischen einem milden, moderaten und starken Schädigungsniveau der Sehnerven von DBA/2J Mäusen (Anderson *et al.* 2005; Libby *et al.* 2005c). Das Ausmaß bzw. die Entwicklung der Sehnervenschädigung kann sich dabei auch zwischen dem linken und rechten Auge des gleichen Tieres unterscheiden (Libby *et al.* 2005a).

Um die Schädigung der Sehnerven von Pax6-Norrin/D2 Mäusen und deren wildtypischen Geschwistertieren zu untersuchen, wurden die *Nn. optici* nach einem Jahr präpariert und in Epon eingebettet. Beide *Nn. optici* einer Maus wurden dabei als 2 unabhängige Proben gewertet. Anhand von sagittalen Semidünnschnitten der Sehnerven wurde die Morphologie untersucht und eine semiquantitative Abschätzung



der Schadensniveaus (vgl. Abb. 23 K) beider Vergleichsgruppen erstellt. In 50 % der wildtypischen und ca. 80 % der transgenen Proben fanden sich eine milde Veränderung des Sehnerven (vgl. Abb. 23 A-D), die keine oder nur wenig geschädigte Axone, mit intensiv gefärbter Myelinscheide, aufwiesen. Moderat geschädigte *Nn. optici*, die durch insgesamt weniger Axone, vermehrt degenerierende Markscheiden und dem Auftreten glialer Vernarbung gekennzeichnet sind (vgl. Abb. 23 E-H), konnten in ca. 20 % der transgenen und 10 % der wildtypischen Sehnerven beobachtet werden. Eine starke Schädigung zeigte die Hälfte aller wildtypischen *Nn. optici*. Charakteristisch für ein starkes Schadensniveau ist ein massiver Axonverlust und großflächige gliale Narbenareale (vgl. Abb. 23 I-J). Bei ein Jahr alten Pax6-Norrin Mäusen trat diese starke Form der Sehnervenschädigung nicht auf. Zwischen der Schwere der Schädigung des optischen Nervs und den lokalen Anomalien in der Retina (vgl. Abb. 22) konnte in beiden Vergleichsgruppen keine Korrelation nachgewiesen werden.

Um diesen semiquantitativen Befund weiter zu untersuchen, wurde die Axonzahl der *Nn. optici* beider Gruppen ermittelt. Hierfür wurde die Axonzahl in 5 repräsentativen Quadraten (vgl. Abb. 8) bestimmt und auf die gesamte Fläche des jeweiligen Sehnervs extrapoliert. In den wildtypischen Mäusen war die mittlere Axonzahl in den Sehnerven mit  $34230 \pm 4860,5$  deutlich geringer als in den Pax6-Norrin Mäusen, für die im Mittel  $45352,4 \pm 2133,9$  Axone pro *N. opticus* ermittelt wurden (vgl. Abb. 23 L). Dieser Unterschied war mit  $p < 0,06$  jedoch nicht signifikant. Bezieht man die Ergebnisse der semiquantitativen Abschätzung des Schadensniveaus mit ein und betrachtet nur die Axonzahlen der mild geschädigten Sehnerven, so zeigen sich nahezu identische Mittelwerte mit  $47803 \pm 1542,8$  bei den Wildtypen und  $48193,7 \pm 1198,5$  bei den transgenen Tieren. Auch bei den moderat betroffenen *Nn. optici* war bezüglich der Axonzahl, mit 32300 im Wildtypen und einem Mittelwert von  $32566,6 \pm 2159,3$  für die transgenen Sehnerven, kein Unterschied ersichtlich. Stark geschädigte Sehnerven, welche exklusiv in den wildtypischen Kontrollen zu finden waren, wiesen im Mittel  $17746,2 \pm 2361,3$  Axone pro *N. opticus* auf.



**Abb. 23: Pax6-Norrin/D2 Mäuse zeigen einen deutlich geringeren Axonverlust im *N. opticus* als D2 Kontrolltiere.**

A-J: Repräsentative sagittale Semidünnschnitte durch den *N. opticus* ein Jahr alter Pax6-Norrin 04/D2 Mäuse (C, G: Übersicht, D, H: Detail) bzw. D2 Wildtypen (A, E, I: Übersicht, B, F, J: Detail). Lichtmikroskopisch lassen sich die *Nn. optici*, hinsichtlich des Grades ihrer Schädigung, in drei Klassen einteilen (Anderson *et al.* 2005; Libby *et al.* 2005c). In beiden Versuchsgruppen finden sich mild geschädigte *Nn. optici* (A-D), die keine oder wenig geschädigte (Schädigung sichtbar an der intensiveren Färbung der Myelinscheiden) Axone aufweisen. Auch moderat geschädigte Sehnerven (E-H), erkennbar an einer geringeren Axonzahl, mehr geschädigten Axonen und glialer Vernarbung (\*), sind in beiden Gruppen vorhanden. Stark geschädigte Sehnerven (I, J) mit massivem Axonverlust und großflächigen glialen Narben (\*) finden sich nur in den DBA/2J Wildtypen. Maßstabsbalken: A, C, E, G, I, 50  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, H, J, 10  $\mu\text{m}$ . K: Semiquantitative Abschätzung der Häufigkeit der 3 Schadensniveaus (siehe oben) der *Nn. optici*. Eine starke Schädigung lässt sich lediglich bei den Wildtypen und nicht bei transgenen Tieren beobachten ( $n \geq 10$ ). L: Quantifizierung der Axonzahl der *Nn. optici*, ermittelt durch Auszählung in 5 Quadranten (mit einer Fläche von jeweils  $1600 \mu\text{m}^2$ ) eines digital eingblendeten Rasters (vgl. Abb. 8) und Hochrechnung auf die Gesamtfläche der *Nn. optici* (Fläche begrenzt durch die *Pia mater*). Die Bestimmung der Axonzahl zeigt in den Wildtypen eine tendenziell niedrigere Axonzahl ( $p < 0,06$ ) als in den Transgenen (Einzelwerte bzw. Mittelwert  $\pm$  SEM).

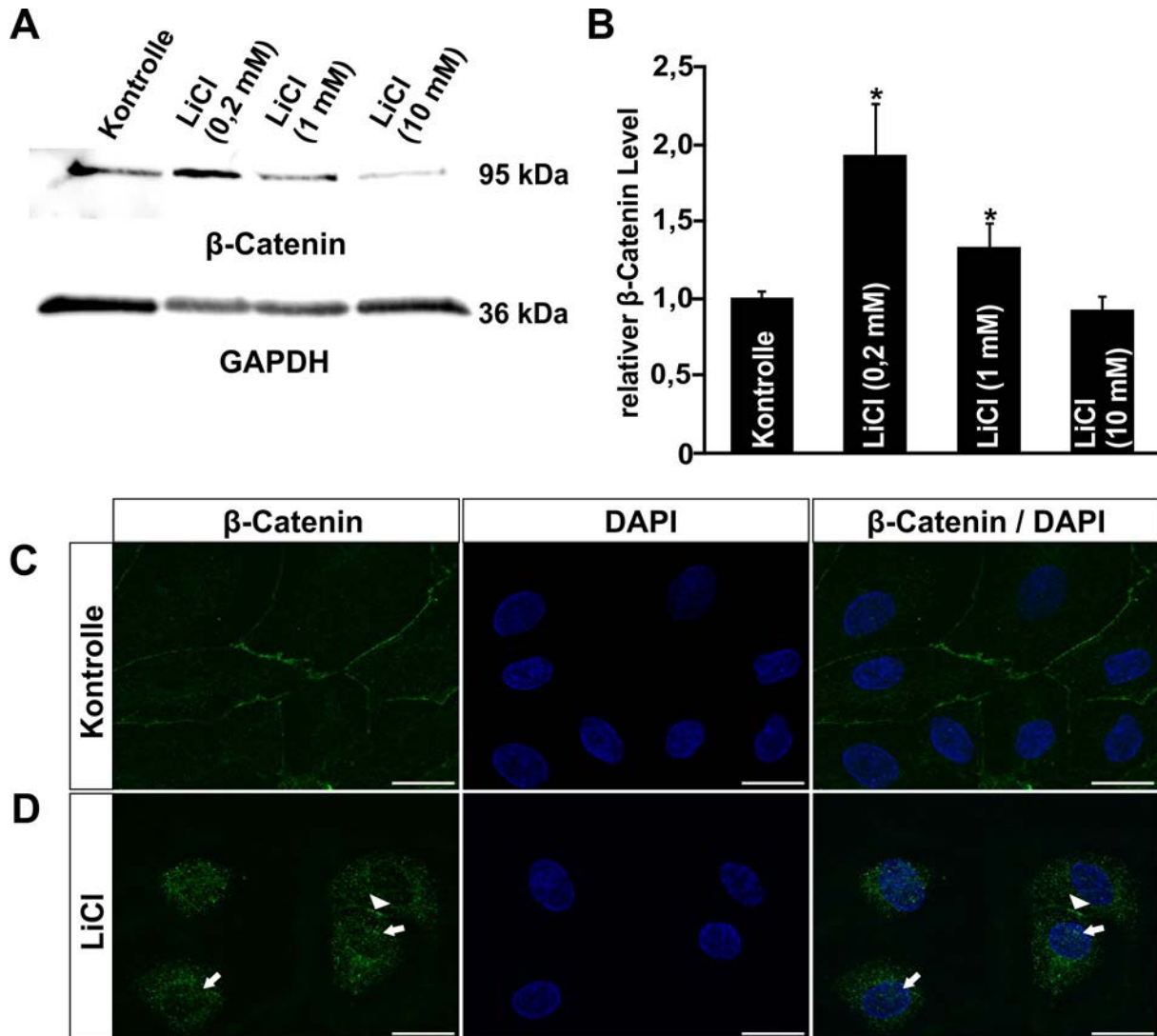
## 4.2 Untersuchung der angiogenen Wirkung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs

Norrin induziert angiogene Eigenschaften in mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro* und fördert die Rekapillarisation ischämischer Retinabereiche nach Hyperoxie-Behandlung von Mäusen im OIR (Sauerstoff-induzierte Retinopathie)-Modell (Ohlmann *et al.* 2010). Es konnte gezeigt werden, dass durch Dickkopf-1, einen Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, diese Norrin-induzierten *in vitro* und *in vivo* Effekte blockiert werden können (Ohlmann *et al.* 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch Lithiumchlorid (LiCl) und SB216763 (vgl. 1.1.4.2.1), beides Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs, angiogene Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* vermitteln. Ein Teil der *in vitro* Versuche wurde in Zusammenarbeit mit Verena Knobloch ausgeführt. Der von Frau Knobloch geleistete Beitrag zu den Experimenten ist in den Abbildungslegenden vermerkt.

### 4.2.1 Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in mikrovaskulären Endothelzellen durch LiCl und SB216763

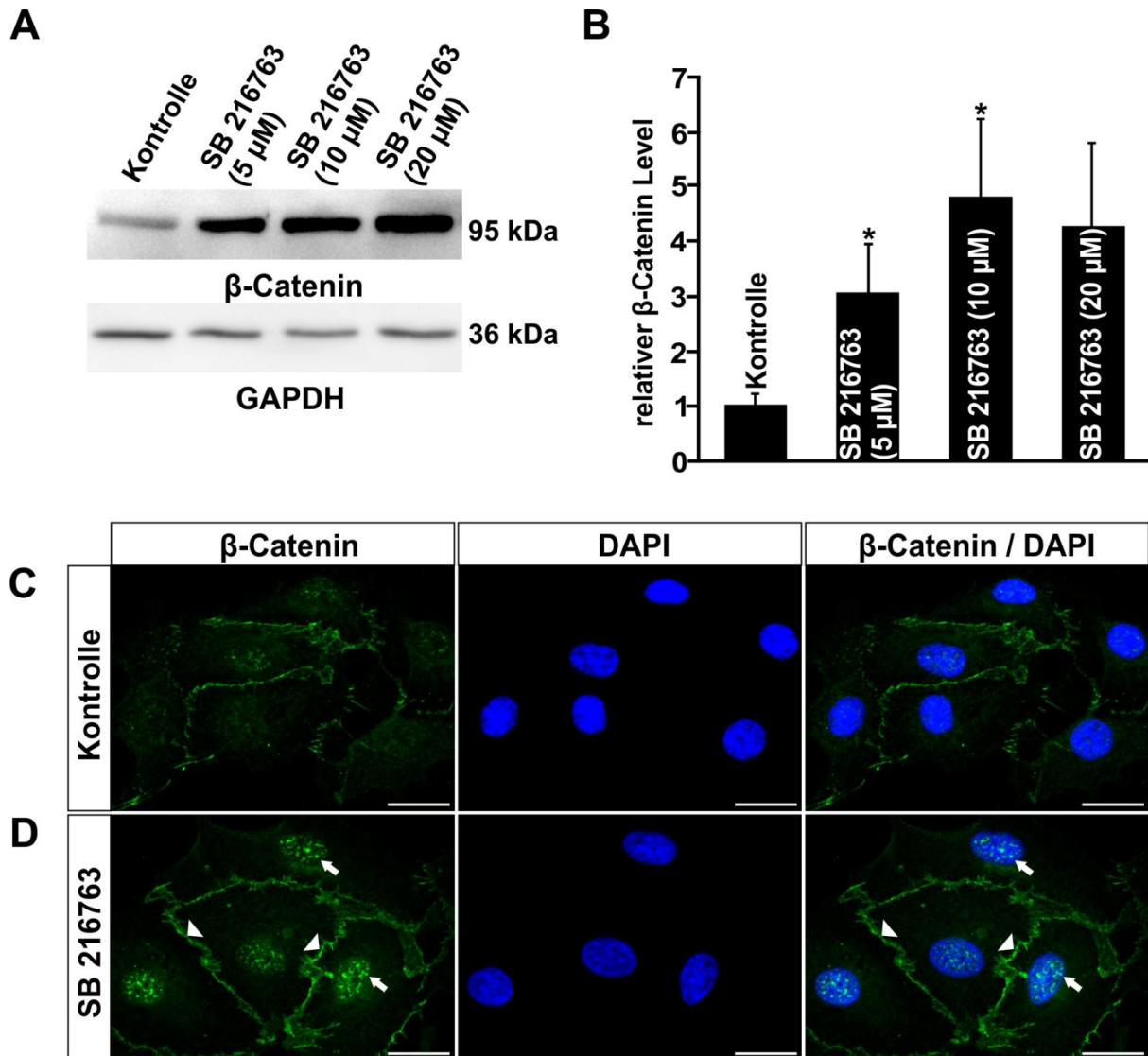
In einem ersten Schritt wurden primäre HDMEC (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen) *in vitro* mit LiCl bzw. SB216763 behandelt, um die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch Hemmung der GSK-3 $\beta$  (vgl. 1.1.4.2.1) zu analysieren. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 3 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von LiCl (0,2 mM, 1 mM und 10 mM) bzw. SB216763 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). Die verwendeten Konzentrationen für LiCl und SB216763 lagen dabei innerhalb des gebräuchlichen Dosisbereichs (Coghlan *et al.* 2000; Klein & Melton 1996). Nach einer 3-stündigen Behandlung wurde aus den Zellen das Gesamtprotein isoliert, welches dann in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin untersucht wurde. Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von mit LiCl behandelten HDMEC ergab eine konzentrationsabhängige signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung des  $\beta$ -Catenin Levels um  $93,3 \pm 33,3 \%$  bei 0,2 mM LiCl bzw. um  $34 \pm 15,8 \%$  bei 1 mM LiCl, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Abb. 24 A, B). Die Inkubation mit SB21676 zeigte in der densitometrischen Analyse ebenfalls eine konzentrationsabhängige signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung des  $\beta$ -Catenin-gehalts im Gesamtprotein um das  $3,1 \pm 0,9$ -fache bei 5  $\mu$ M SB216763 bzw.  $4,8 \pm$

1,4-fache bei 10  $\mu$ M SB216763 (vgl. Abb. 25 A, B). Auch bei Behandlung mit 20  $\mu$ M SB216763 war, im Vergleich zu den Kontrollzellen, ein Anstieg um das  $4,3 \pm 1,6$ -fache zu verzeichnen, der sich jedoch als nicht signifikant ( $p < 0,08$ ) erwies.



**Abb. 24: LiCl aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in HDMEC.**

A, B: Repräsentative Western Blot Analyse (A) und densitometrische Auswertung (B; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n \geq 6$ ; \*  $p < 0,05$ ) des  $\beta$ -Catenin Levels im Gesamtprotein von humanen dermalen mikrovasculären Endothelzellen (HDMEC) nach 3-stündiger Inkubation mit Lithiumchlorid (LiCl; 0,2 mM, 1 mM und 10 mM). Zur Densitometrie (B) wurden die Werte für  $\beta$ -Catenin gegen die Ladungskontrolle GAPDH (A) normalisiert. C, D: Immunzytochemische Färbung mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (grün) in HDMEC, nach 3-stündiger Inkubation mit 1 mM LiCl (D), und unbehandelten Kontrollzellen (C). Eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin ist im Nukleus (Pfeile) und im perinukleären Zytoplasma von mit LiCl behandelten Zellen festzustellen (D).  $\beta$ -Catenin ist darüber hinaus im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (C, D; Pfeilspitze) lokalisiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



**Abb. 25: SB216763 aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in HDMEC.**

A, B: Repräsentative Western Blot Analyse (A) und densitometrische Auswertung (B; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 5$ ; \*  $p < 0,05$ ; ein Versuch wurde von Verena Knobloch durchgeführt) des  $\beta$ -Catenin Levels im Gesamtprotein von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) nach 3-stündiger Inkubation mit SB216763 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). Zur Densitometrie (B) wurden die Werte für  $\beta$ -Catenin gegen die Ladungskontrolle GAPDH (A) normalisiert. C, D: Immunzytochemische Färbung mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin (grün) in HDMEC, nach 3-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M SB216763 (D), und in Kontrollzellen (C). Eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin ist im Nukleus (Pfeile) von mit SB216763 behandelten Zellen festzustellen (D).  $\beta$ -Catenin ist darüber hinaus im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (C, D; Pfeilspitzen) lokalisiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

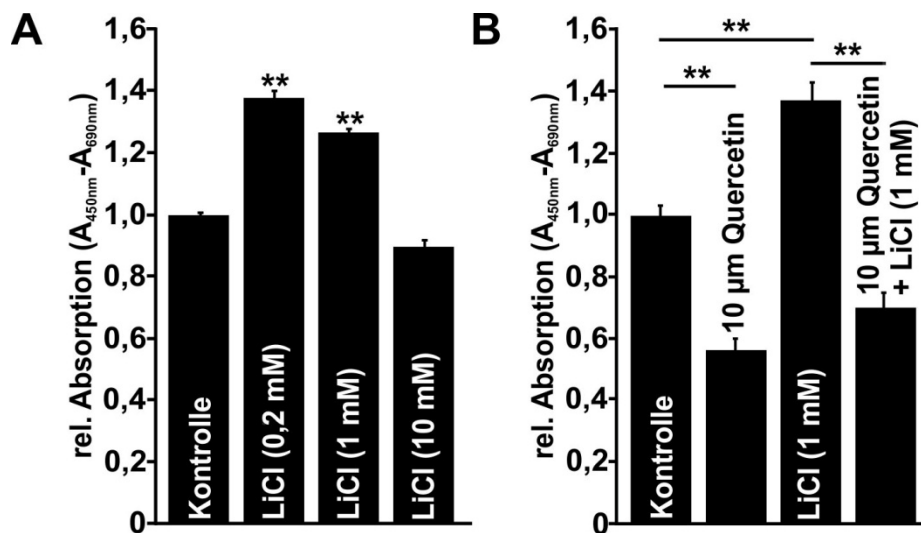
Um aufzuklären, ob  $\beta$ -Catenin nur im Zytoplasma der Zellen akkumuliert oder auch in den Nukleus transloziert, wodurch der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert wird (vgl. 1.1.4), wurden immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin durchgeführt. Hierzu erfolgte eine 3-stündige Behandlung von HDMEC mit 1 mM LiCl bzw. 10  $\mu$ M SB216763. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die immunzytochemischen Färbungen vorgenommen. In der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung



tung konnte  $\beta$ -Catenin, als Komponente der „Adherens junctions“ (Yap *et al.* 1997), in den Kontrollzellen, den LiCl- und den SB216763-behandelten Zellen im Bereich der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert werden (vgl. Abb. 24 C, D sowie Abb. 25 C, D). Eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im perinukleären Zytoplasma und im Nukleus war, im Unterschied zu unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 24 C), in den mit 1 mM LiCl inkubierten HDMEC zu erkennen (vgl. Abb. 24 D). Die SB216763-behandelten Zellen wiesen eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus auf (vgl. Abb. 25 D), während die Färbung für  $\beta$ -Catenin im Zellkern entsprechender Kontrollzellen weit- aus geringer war (vgl. Abb. 25 C). Somit scheinen sowohl LiCl als auch SB216763 in HDMEC den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren zu können.

#### 4.2.2 Vermittlung angiogener Eigenschaften auf mikrovaskuläre Endothelzellen durch LiCl und SB216763 *in vitro*

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob LiCl und SB216763, ähnlich wie Norrin, eine positive Wirkung auf die Proliferation, Viabilität und Migration von mikrovaskulären Endothelzellen haben.

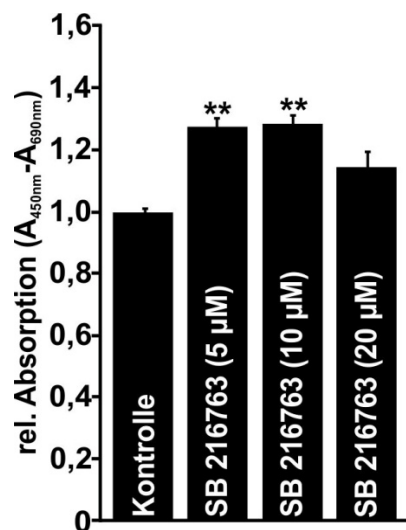


**Abb. 26: LiCl induziert die Proliferation von HDMEC über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.**

A: Die Proliferation von HDMEC wurde nach 24-stündiger Inkubation mit LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM) mittels BrdU-ELISA (Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten,  $n \geq 63$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) quantifiziert. B: Effekt von 1 mM LiCl auf die Proliferation von HDMEC, bei Koinkubation mit dem TCF-Inhibitor Quercetin (10  $\mu$ M) für 24 Stunden (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten;  $n \geq 23$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ein Experiment wurde von Verena Knobloch durchgeführt).

Der Einfluss von LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM) bzw. SB216763 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) auf die Proliferation von primären HDMEC wurde nach 24-stündiger Behandlung mittels BrdU-ELISA analysiert. Dabei ergab sich, im Vergleich zur Kontrolle, eine konzentrationsabhängige, hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Induktion der Proliferation um  $38,0 \pm 1,9$  % für 0,2 mM LiCl sowie  $27,1 \pm 1,0$  % für 1 mM LiCl (vgl. Abb. 26 A). Bei 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Quercetin, einem Inhibitor der  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelten transkriptionellen Regulation (Park *et al.* 2005), war die Proliferation hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) auf den  $0,5 \pm 0,04$ -fachen Wert der Kontrolle gesenkt (vgl. Abb. 26 B). Die Kokubation von HDMEC mit 1 mM LiCl sowie 10  $\mu$ M des Inhibitors Quercetin konnte die Proliferation hoch signifikant ( $p < 0,01$ ), um ca. 50 %, im Vergleich zur Behandlung mit 1 mM LiCl, reduzieren (vgl. Abb. 26 B). Die Induktion der Proliferation von HDMEC durch LiCl scheint somit über den kanonischen Wnt-Signalweg zu erfolgen.

Für SB216763 wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige, hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Erhöhung der Proliferation von HDMEC ermittelt (vgl. Abb. 27). So lag der Wert bei Behandlung mit 5  $\mu$ M SB216763  $27,8 \pm 3,1$  % bzw. mit 10  $\mu$ M SB216763  $29,0 \pm 2,3$  % über dem von Kontrollzellen.

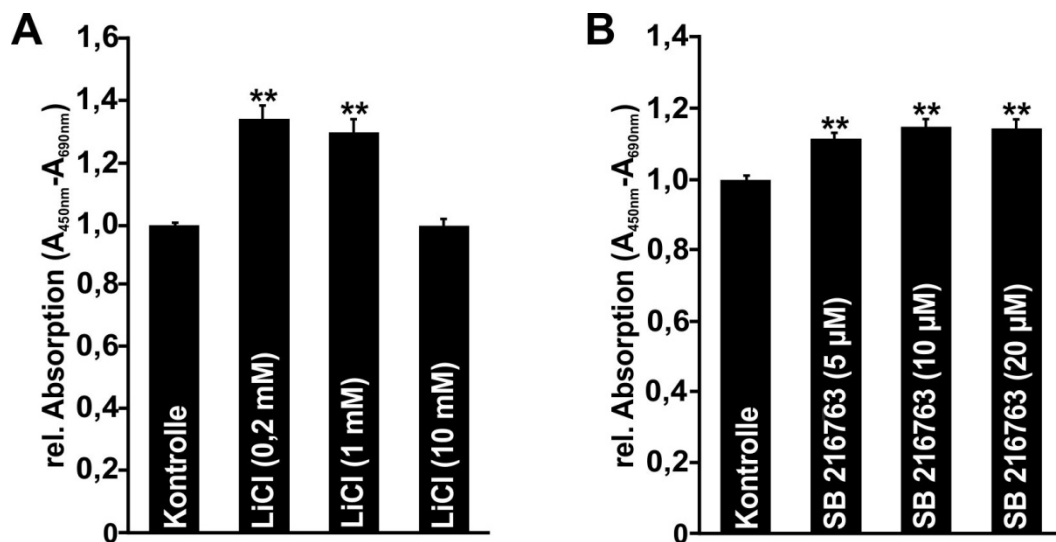


**Abb. 27: SB216763 induziert die Proliferation von HDMEC.**

Die Proliferation von HDMEC wurde nach 24-stündiger Inkubation mit SB216763 (5, 10 und 20  $\mu$ M) mittels BrdU-ELISA bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten;  $n = 64$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ein Experiment wurde von Verena Knobloch durchgeführt).

Der Effekt von LiCl und SB216763 auf die Zellviabilität wurde mittels WST-1 Assay analysiert. Hierzu wurden primäre HDMEC zuvor für 36 Stunden mit LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM) bzw. SB216763 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) inkubiert. Verglichen mit der

Kontrolle ergab sich eine Steigerung der Viabilität von HDMEC durch 0,2 mM LiCl um  $35,2 \pm 4,1$  % bzw. durch 1 mM LiCl um  $30,6 \pm 4,0$  % (vgl. Abb. 28 A). Die Induktion der Zellviabilität durch LiCl war hoch signifikant ( $p < 0,01$ , bei 0,2 mM und 1 mM LiCl) und konzentrationsabhängig. Bei SB216763 konnten alle getestete Konzentrationen die Viabilität von HDMEC im Vergleich zu Kontrollzellen hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) steigern (vgl. Abb. 28 B). Dabei war jedoch maximal ein Anstieg der Zellviabilität um  $14,7 \pm 2,4$  % (bei Inkubation 10  $\mu$ M SB216763) zu verzeichnen. Die biologische Relevanz dieses Befundes bezüglich SB216763 erscheint daher zweifelhaft. Aus diesem Grund wurden die Untersuchung der Zellmigration *in vitro* sowie die *in vivo* Versuche auf die Betrachtung der LiCl-vermittelten Effekte beschränkt.



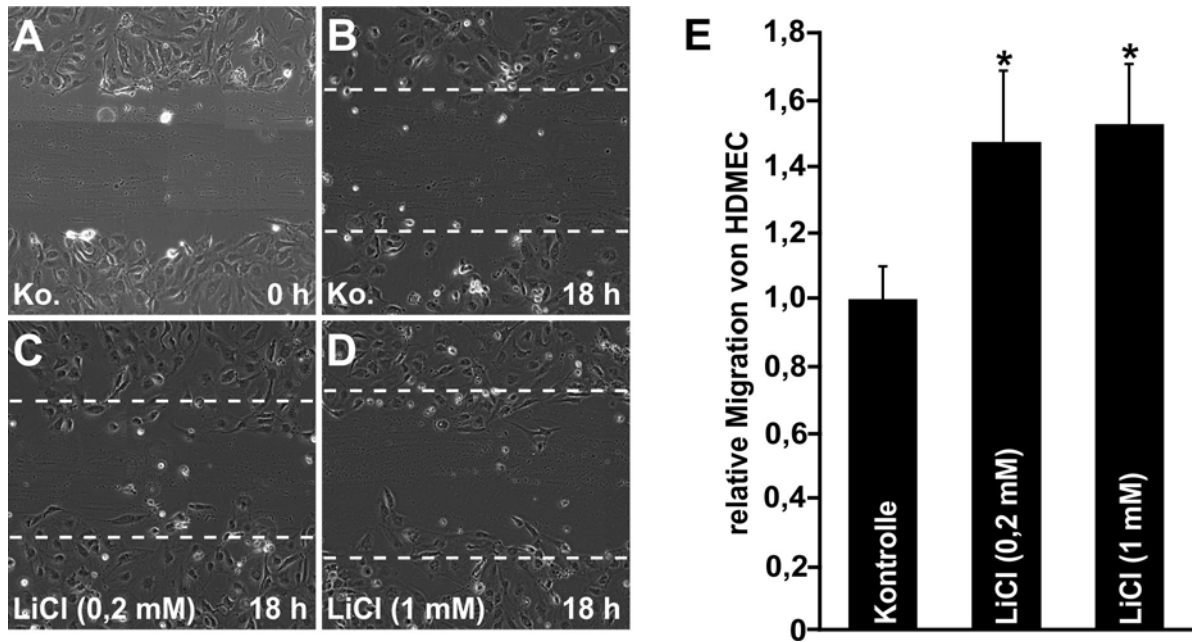
**Abb. 28: LiCl und SB216763 steigern die Viabilität von HDMEC.**

A, B: Quantifizierung der Viabilität von HDMEC nach 72-stündiger Inkubation mit LiCl (0,2 mM, 1 mM, 10 mM) oder SB216763 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). LiCl (0,2 mM und 1 mM) konnte die Viabilität merklich steigern, während SB216763 (in allen getesteten Konzentrationen) nur einen leicht positiven Effekt auf die Viabilität vermitteln konnte (Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten,  $n \geq 56$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Zur Analyse der Zellmigration von primären HDMEC unter dem Einfluss von LiCl kam der Wundheilungsassay zum Einsatz. Dazu wurde in den konfluenten Zellrasen eine Läsion gesetzt und die Zellen anschließend für 18 Stunden mit LiCl inkubiert. Die Versuche erfolgten nur mit den LiCl-Konzentrationen (0,2 mM sowie 1 mM), welche einen positiven Effekt auf Proliferation und Viabilität der HDMEC gezeigt hatten. Zusätzlich war die Zellteilung während den Behandlungen mit LiCl bzw. in den Kontrollen durch Gabe des Zytostatikums Mitomycin C unterbunden. Die HDMEC-Migration wurde anhand von Phasenkontrastbildern der Läsionen (vgl. Abb. 29 A-D), vor und nach der Behandlung, quantifiziert. An diesen Aufnahmen wurde die



Migrationsfläche, also die Fläche der Läsion nach 0 Stunden abzüglich der Läsionsfläche nach 18 Stunden, bestimmt und auf die Länge der Läsion bezogen. Im Verhältnis zu Kontrollzellen, war die relative Migration bei Behandlung mit 0,2 mM LiCl um  $48,1 \pm 21,1$  % bzw. mit 1 mM LiCl um  $53,1 \pm 18,0$  % signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht (vgl. Abb. 29 E). Folglich zeigte LiCl nicht nur eine positive Wirkung auf die Proliferation und Viabilität von HDMEC, sondern auch auf deren Migrationsverhalten.

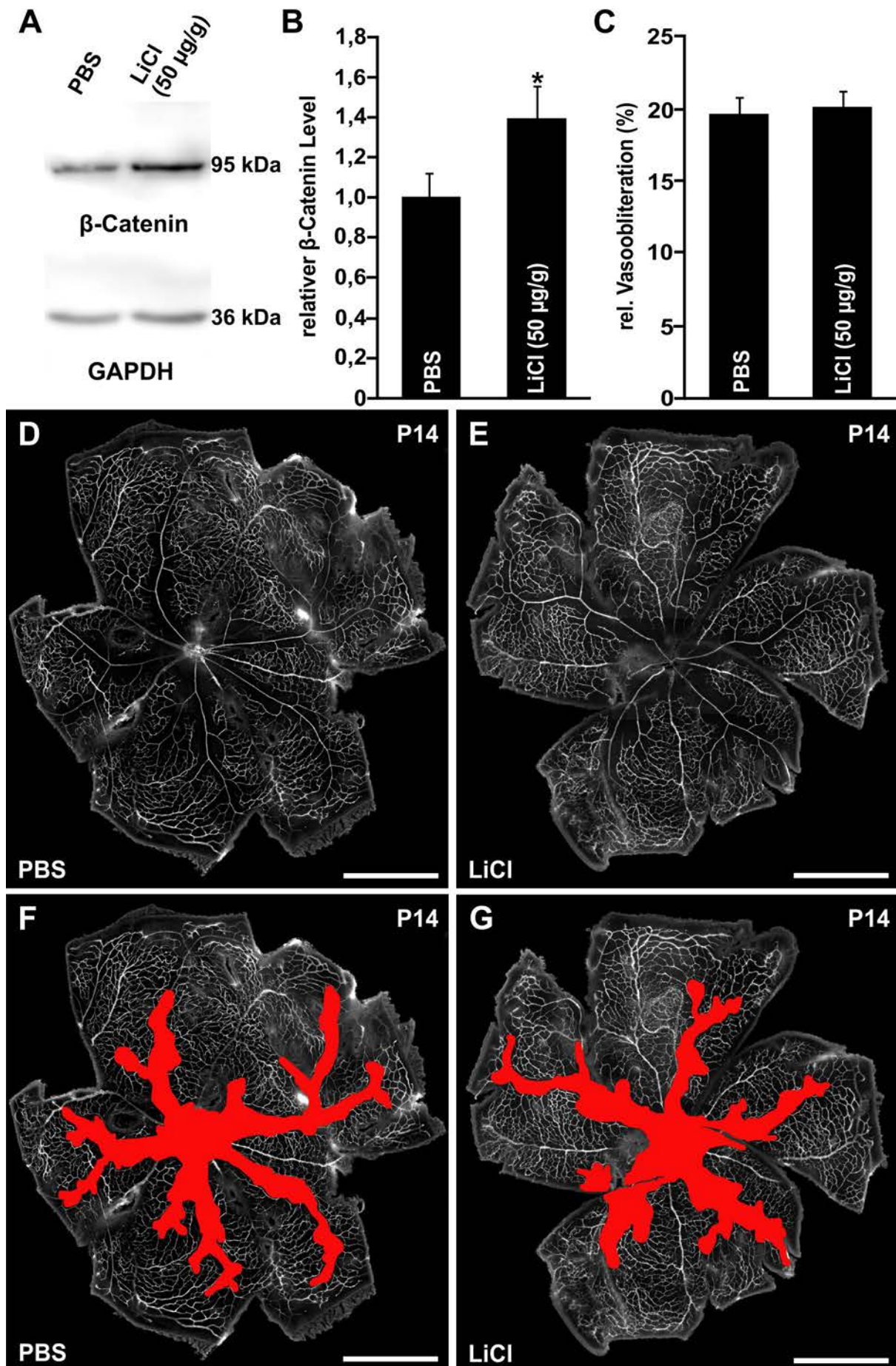


**Abb. 29: LiCl induziert die Migration von HDMEC.**

A-D: Repräsentative Aufnahmen eines Wundheilungsassays an HDMEC, direkt nach Setzen der Läsion in den konfluenten Zellrasen (A), 18 h danach (B) sowie nach Läsion und anschließender 18-stündiger Inkubation mit LiCl (C, D). Weiße gestrichelte Linie: B, C, D, Läsionsfront nach 0 h. E: Zur Quantifizierung der Migration wurde die Migrationsfläche (Fläche Läsion nach 0 h abzüglich Fläche Läsion nach 18 h) auf die Länge der Läsion bezogen und als relative Migration in Bezug auf die Kontrolle angegeben (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten;  $n = 15$ ; \*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Wirkung von LiCl auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Generierung einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie

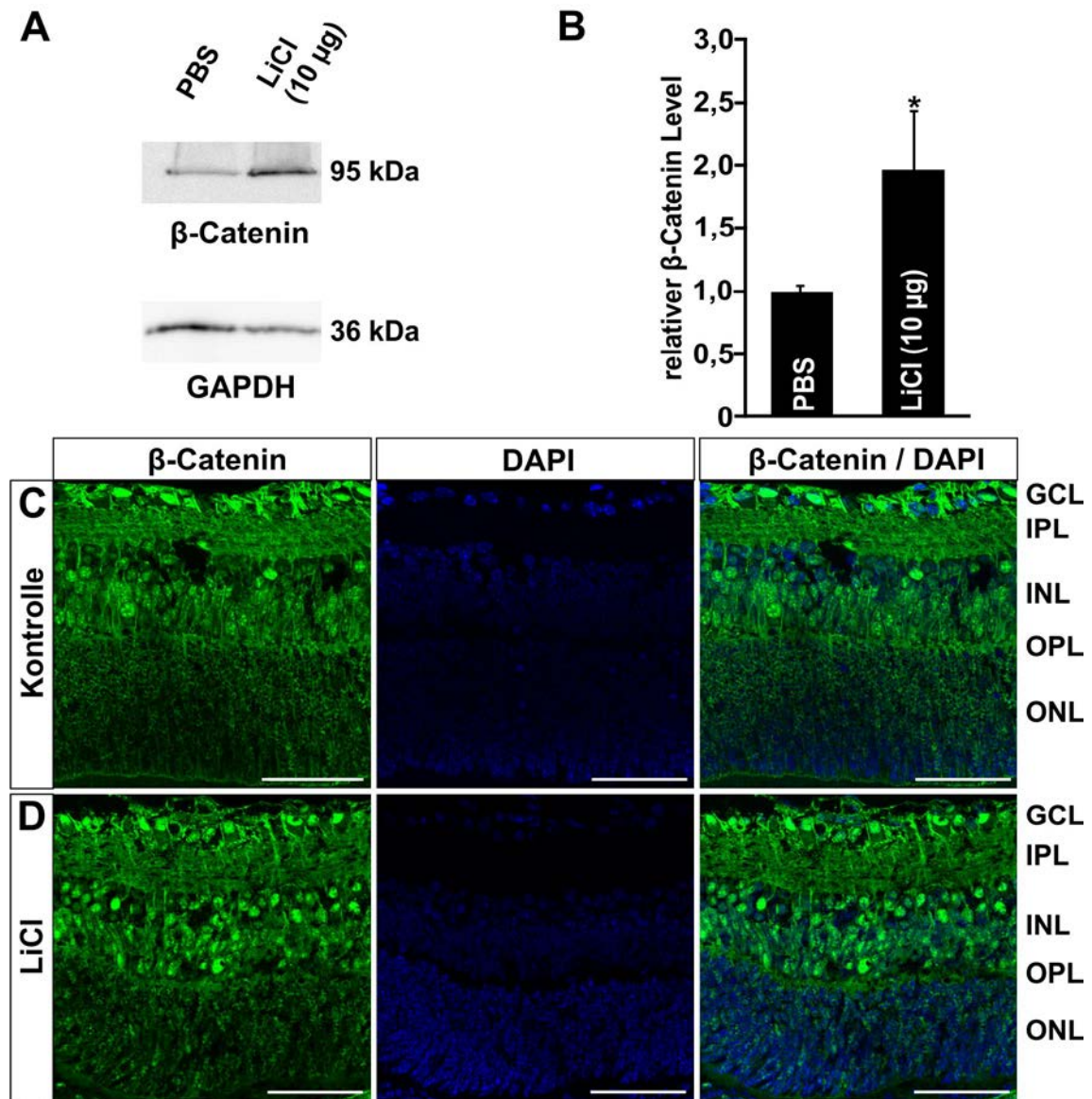
Um den Effekt von LiCl auf vasoobliterierte, ischämische Areale der Retina von Mäusen nach Hyperoxie-Exposition im OIR (Sauerstoff-induzierte Retinopathie)-Modell (vgl. 1.2.4) zu analysieren, wurde FVB/N Mäusen an P12, nach 5-tägiger Haltung in einer 75 %-igen Sauerstoffatmosphäre, LiCl intraperitoneal injiziert. Die verabreichte LiCl-Dosis lag dabei mit 50  $\mu$ g/g Körpergewicht in einem für Mausexperimente üblichen Bereich (Beaulieu *et al.* 2008; Park *et al.* 2009).



**Abb. 30: Intraperitoneal injiziertes LiCl hat keinen Einfluss auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Induktion einer OIR.**

A, B: Western Blot Analyse (A) und densitometrische Auswertung (B) der  $\beta$ -Catenin-Spiegel im retinalen Gesamtprotein von FVB/N Mäusen, 6 Stunden nach intraperitonealer Injektion von LiCl (50  $\mu$ g pro g Körpergewicht) bzw. PBS und vorhergehender 75-prozentiger Sauerstoffexposition zwischen P7 und P12. Die gegen die Ladungskontrolle GAPDH (A) normalisierte Densitometrie (B) zeigt eine signifikante Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in der Retina nach intraperitonealer LiCl-Injektion (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten;  $n = 13$ ; \*  $p < 0,05$ ). D-G: Repräsentative retinale Häutchenpräparate von FVB/N Mäusen nach Perfusion mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Dextran an P14 nach einer durch Sauerstoff induzierten Retinopathie und intraperitonealen LiCl-Injektionen (ab P12 alle 12 Stunden eine Injektion, insgesamt 3x 50  $\mu$ g pro g Körpergewicht; E, G) oder PBS-Injektionen (D, F). In F und G ist die vasoobliterierte Fläche rot hervorgehoben. Maßstabsbalken: 1000  $\mu$ m. C: Quantifizierung der relativen Vasoobliteration (entspricht dem prozentualen Anteil der vasoobliterierten Fläche an der gesamten Fläche des oberflächlichen Plexus der Retina) an P14. Hierbei lässt sich kein Unterschied in der relativen Vasoobliteration nach intraperitonealer PBS- oder LiCl-Injektion feststellen (Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten;  $n \geq 13$ ).

Kontrolltiere erhielten PBS mit äquivalentem Volumen. Anhand der Untersuchung von Gesamtprotein aus der Retina von Mäusen, 6 Stunden nach der intraperitonealen Injektion, wurde zunächst geprüft, ob die gewählte LiCl-Konzentration ausreicht, um den  $\beta$ -Catenin-Proteinspiegel in der Netzhaut zu erhöhen, was eine Voraussetzung für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs darstellt. Dazu wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Catenin durchgeführt (vgl. Abb. 30 A). Bei der densitometrischen Auswertung fand sich in den mit LiCl-injizierten Mäusen ein, im Vergleich zu den PBS-Kontrollen, um  $40,0 \pm 15,2$  % signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhter  $\beta$ -Catenin Gehalt (vgl. Abb. 30 B). Auf Grund dieses Befundes wurde diese LiCl-Konzentration für die weitere Untersuchung der Rekapillarisation beibehalten. Dafür wurde Mäusen beginnend ab P12, nach der Hyperoxie-Exposition, 3x 50  $\mu$ g LiCl pro g Körpergewicht (bzw. PBS bei den Kontrollmäusen), im Abstand von jeweils 12 Stunden, intraperitoneal injiziert. An P14, einen halben Tag nach der letzten LiCl-Gabe, wurden die Tiere mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Dextran perfundiert, um so die retinalen Gefäße zu visualisieren. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von retinalen Häutchenpräparaten zeigte in beiden Vergleichsgruppen eine zentrale, um die retinalen Arterien lokalisierte, vasoobliterierte Zone (vgl. Abb. 30 D-G). Die Quantifizierung der relativen Vasoobliteration, welche dem prozentualen Anteil der vasoobliterierten Fläche am gesamten Areal des oberflächlichen Gefäßplexus entspricht, betätigte die Beobachtung und bot ebenfalls keinen Hinweis auf einen Unterschied zwischen PBS- und LiCl-behandelten Mäusen (vgl. Abb. 30 C). Auf die Rekapillarisation ischämischer Netzhautareale im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, wies die mehrfache intraperitoneale Injektion von LiCl nach Hyperoxiebehandlung somit keine Wirkung auf.



**Abb. 31: Intraperitoneale LiCl-Injektion induziert β-Catenin-Akkumulation in der INL.**

A, B: Western Blot Analyse (A) und Densitometrie (B) des Levels von β-Catenin im retinalen Gesamtprotein von FVB/N Mäusen, 6 Stunden nach intravitrealer Injektion von LiCl (10 μg) bzw. PBS (im Partnerauge) und vorhergehender 75-prozentiger Sauerstoffexposition zwischen P7 und P12. Die gegen die Ladungskontrolle GAPDH (A) normalisierte Densitometrie (B) zeigt eine signifikante Akkumulation von β-Catenin in der Retina nach LiCl-Injektion in den Glaskörper (Mittelwert ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten; n = 11; \* p < 0,05). C, D: Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen β-Catenin (grün) in sagittalen Kryoschnitten der Retina von FVB/N Mäusen, 6 Stunden nach intravitrealer Injektion mit LiCl (10 μg; D) bzw. PBS (C) an P12 und vorhergehender 5-tägiger Hyperoxie. In mit LiCl injizierten Mäusen zeigt sich eine Akkumulation von β-Catenin in der inneren Körnerschicht, die nach PBS-Injektion nicht in dieser Stärke zu finden ist. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. GCL: Ganglienzellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken: 50 μm.

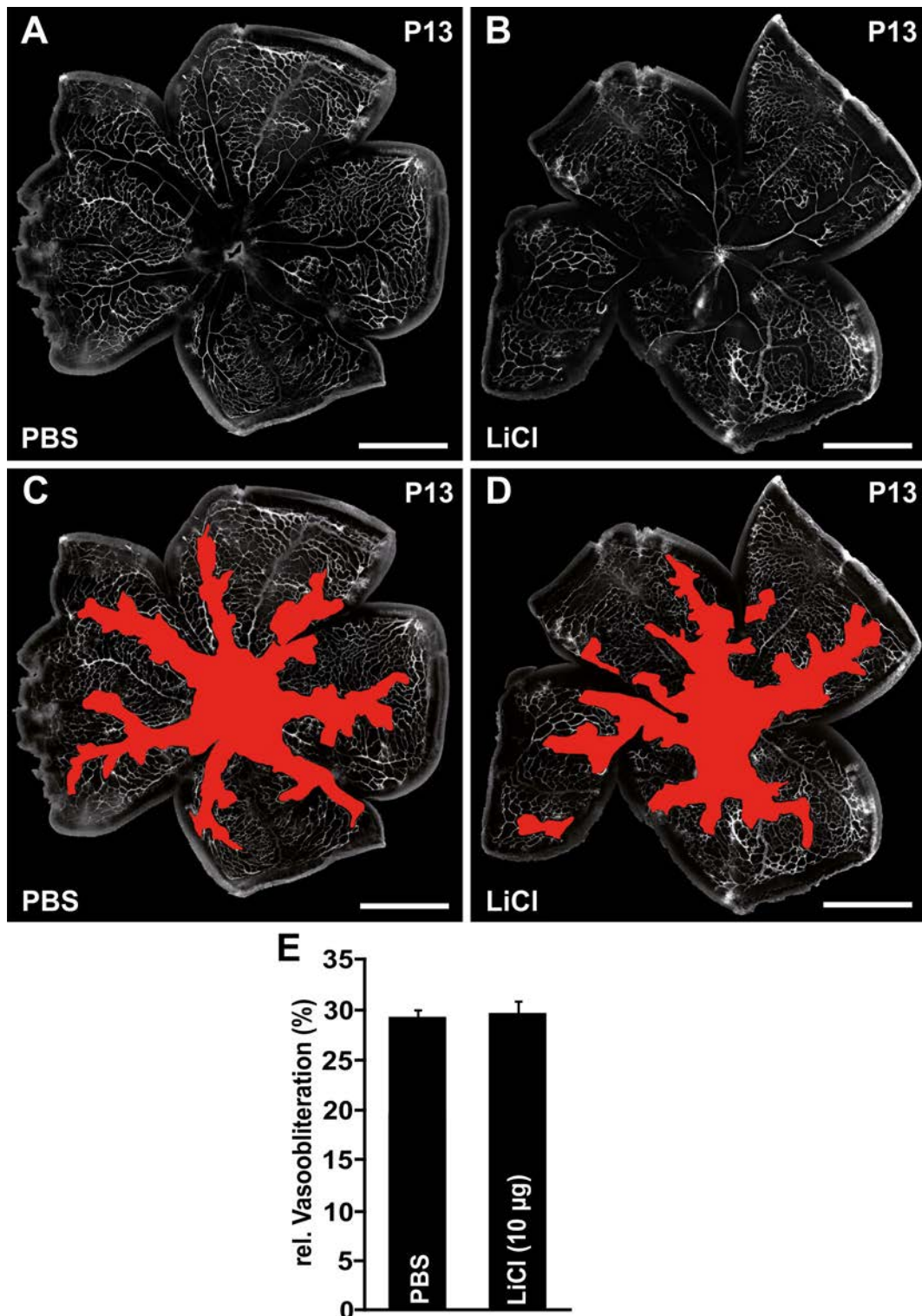
Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz LiCl direkt in den Glaskörper injiziert. Wie schon bei der intraperitonealen Injektion, erfolgte auch die intravitreale Injektion von 10 μg LiCl (1 μl) bzw. 1 μl PBS an P12, nach der 5-tägigen Behandlung von FVB/N Mäusen mit 75 % Sauerstoff. Sechs Stunden nach der intravitrealen LiCl-In-



jektion ergaben Western Blot Analysen mit  $\beta$ -Catenin-Antikörpern (vgl. Abb. 31 A), in der densitometrischen Auswertung (vgl. Abb. 31 B), eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Zunahme des  $\beta$ -Catenin Levels im retinalen Gesamtprotein um  $97,4 \pm 46,5$  % gegenüber dem Kontrollniveau. Zusätzlich wurde die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in immunhistochemischen Färbungen untersucht. Damit sollte festgestellt werden, ob  $\beta$ -Catenin nur im Zytoplasma akkumuliert oder auch im Nukleus lokalisiert ist, zumal Letzteres einen Hinweis auf eine tatsächliche Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs gibt. Hierzu wurden Mäuse an P12 nach Hyperoxie, wie oben beschrieben, intravitreal mit LiCl bzw. PBS injiziert. Die Augen wurden 6 Stunden danach entnommen und für die Herstellung von Kryoschnitten eingebettet. An sagittalen Kryoschnitten der Retina von mit PBS behandelten Mäusen ließ sich eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in Kernen der retinalen Ganglienzellen und eine überwiegend schwache Färbung in den Zellkernen der inneren Körnerschicht (INL) erkennen (vgl. Abb. 31 C). Im Gegensatz zur PBS-Kontrolle zeigte sich in sagittalen Schnitten der LiCl-injizierten Tiere in den Nuklei der INL eine sehr prominente Färbung für  $\beta$ -Catenin (vgl. Abb. 31 D). Diese war besonders deutlich ausgeprägt im inneren Abschnitt der INL, der hauptsächlich die Kerne der Amakrinzellen enthält. Ähnlich wie in den PBS-Kontrollen war bei den LiCl-injizierten Mäusen in nahezu allen Kernen der Ganglienzellschicht eine deutliche Akkumulation von  $\beta$ -Catenin nachzuweisen.

Um die Wirkung der intravitrealen LiCl-Injektion auf die Rekapillarisation ischämischer Areale zu untersuchen, wurden die Mäuse, wie zuvor beschrieben, an P12 behandelt. Nach dieser einen Intravitrealen Injektion wurden die Tiere an P13 mit FITC-Dextran perfundiert. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von retinalen Häutchenpräparaten zeigte in PBS- sowie LiCl-injizierten Mäusen zentrale, sich entlang der Arterien ausbreitende, avaskuläre, vasoobliterierte Zonen (vgl. Abb. 32 Abb. 31A-D). Zwischen den beiden Vergleichsgruppen (LiCl vs. PBS) konnte bei genauer Analyse der relativen Vasoobliteration wiederum kein Unterschied ermittelt werden (vgl. Abb. 32 E).

Zusammengefasst kann die intravitreale Injektion demnach nach Hyperoxie-Exposition, trotz Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der INL, keine Wirkung auf die Rekapillarisation vasoobliterierter Netzhautbereiche im OIR-Modell vermitteln.



**Abb. 32: Intravitreale LiCl-Injektion hat keinen Einfluss auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Induktion einer OIR.**

A-D: Exemplarische retinale Häutchenpräparate von FVB/N Mäusen nach Perfusion mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Dextran an P13 nach 5tägiger Hyperoxie (75 % Sauerstoff zwischen P7 und P12) und einer intravitrealen LiCl-Injektionen (10 µg; B, D) oder PBS-Injektionen (A, C) an P12. In C und D ist die vasoobliterierte Fläche rot eingefärbt. Maßstabsbalken: 1000 µm. E: Quantifizierung der relativen Vasoobliteration an P13, welche den prozentualen Anteil der vasoobliterierten Fläche an der gesamten Fläche des oberflächlichen Plexus der Retina wiedergibt. Hierbei lässt sich kein Unterschied in der relativen Vasoobliteration nach PBS- oder LiCl-Injektion in den Glaskörper erkennen (Mittelwert  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten;  $n \geq 13$ ).

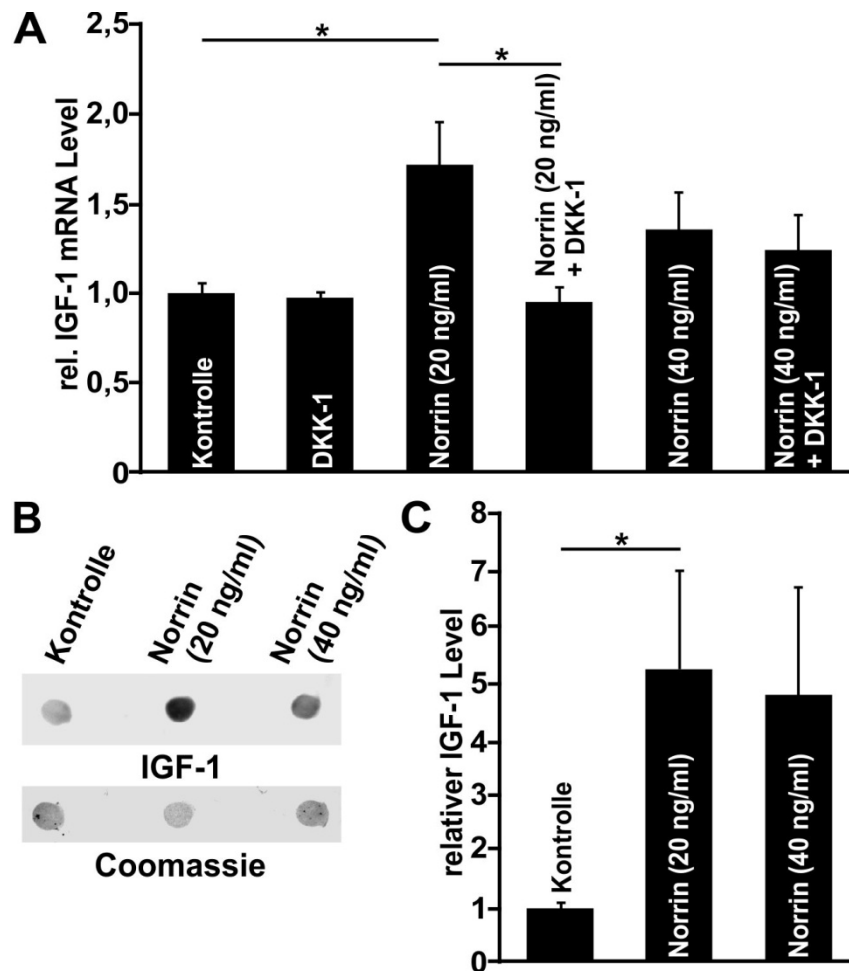
### 4.3 Untersuchung der Norrin-induzierten IGF-1-Expression

IGF-1 („Insulin-like growth factor 1“) spielt als proangiogener Faktor (vgl. 1.2.3) bei der Entwicklung von retinalen Gefäßen, aber auch bei Erkrankungen mit pathologischer Angiogenese, wie der *Retinopathia praematurorum*, eine wichtige Rolle (Hellstrom *et al.* 2001). Bei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte auf mRNA-Ebene eine Induktion der IGF-1-Expression in transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, welche eine ektope Überexpression von Norrin in der Linse besitzen, im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern, gezeigt werden. Ziel dieses Abschnitts war es, primäre mikrovaskuläre Endothelzellen und Müllerzellen *in vitro* auf eine Norrin-induzierte Expression von IGF-1 zu untersuchen. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die rekapillarisierenden protektiven Eigenschaften von Norrin, im Hyperoxie-induzierten ROP (*Retinopathia praematurorum*)-Mausmodell, durch IGF-1 vermittelt werden. Ein Teil der *in vitro* und *in vivo* Versuche wurde in Zusammenarbeit mit Berna Sentürk ausgeführt. Der von Frau Sentürk geleistete Anteil an den Experimenten ist in den Abbildungslegenden vermerkt.

#### 4.3.1 Norrin-vermittelte IGF-1-Expression *in vitro*

Um zu untersuchen, ob Norrin seine angiogene Wirkung (Ohlmann *et al.* 2010) auch über die Induktion von IGF-1 in mikrovaskulären Endothelzellen vermittelt, wurden HDMEC für 24 Stunden mit 20 ng/ml bzw. 40 ng/ml rekombinantem humanem Norrin und/oder DKK-1 (100 ng/ml) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR auf die Expression von IGF-1 hin untersucht. GNB2L1 („Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1“) diente dabei als Referenzgen. Die Analyse des relativen IGF-1 mRNA Levels ergab eine konzentrationsabhängige, signifikante ( $p < 0,05$ ) Expressionssteigerung, durch Behandlung mit 20 ng/ml Norrin, um das  $1,7 \pm 0,3$ -fache, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb. 33 A). Bei Koinkubation mit DKK-1, einem Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (vgl. 1.1.4.2), war die Norrin-vermittelte IGF-1-Expressionssteigerung signifikant ( $p < 0,05$ ) blockiert (vgl. Abb. 33 A). Die ermittelte relative Expression von IGF-1 lag hierbei etwa auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen. Neben der IGF-1-Expression auf mRNA-Ebene wurde auch die Sezernierung

von IGF-1 in das Zellkulturmedium analysiert. Hierzu wurden HDMEC für 36 Stunden mit 20 ng/ml bzw. 40 ng/ml Norrin behandelt und anschließend der Level von IGF-1 im konditionierten Zellkulturmedium mittels Dot Blot Analysen untersucht (vgl. Abb. 33 B). Die densitometrische Auswertung ergab eine konzentrationsabhängige Steigerung des Proteingehalts von IGF-1 im Zellkulturmedium durch die Behandlung mit Norrin (vgl. Abb. 33 C).



**Abb. 33: Norrin induziert die Expression von IGF-1 in HDMEC.**

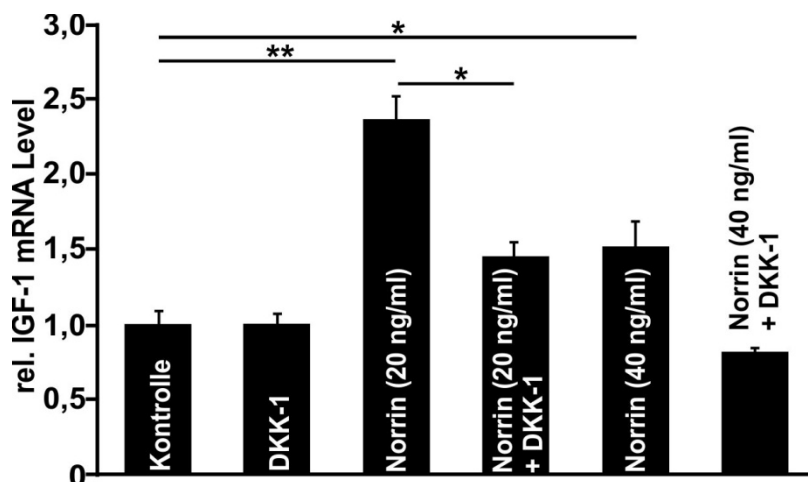
A: Quantitative real-time RT-PCR Analyse der IGF-1-mRNA-Expression in HDMEC, nach 24-stündiger Inkubation mit DKK-1 (100 ng/ml) und/oder Norrin. Die Behandlung mit 20 ng/ml Norrin zeigt eine signifikante Steigerung der IGF-1 mRNA-Expression in HDMEC, welche bei Koinkubation von 20 ng/ml Norrin mit DKK-1 auf Kontrollniveau gesenkt ist (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 6$  (davon 1 Versuch durchgeführt von Berna Sentürk); \*  $p < 0,05$ ). B, C: Repräsentative Dot Blot Analyse (B) und Densitometrie (C) des Proteingehalts von IGF-1 in konditioniertem HDMEC-Medium nach 36-stündiger Behandlung mit unterschiedlichen Norrin-Konzentrationen (20 und 40 ng/ml). Die Densitometriedaten sind normalisiert gegen die Coomassie-Färbung (B), die der Ladungskontrolle dient. Wie in C dargestellt, induziert 20 ng/ml Norrin auch auf Proteinebene die Expression von IGF-1 in signifikanter Weise (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 13$  (davon 5 Versuche durchgeführt von Berna Sentürk); \*  $p < 0,05$ ).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war der IGF-1 Spiegel bei 20 ng/ml Norrin signifikant ( $p < 0,05$ ) um das  $5,2 \pm 1,8$ -fache erhöht. Bei 40 ng/ml Norrin fand sich ein



Anstieg um das  $4,8 \pm 1,9$ -fache, der jedoch unterhalb der Signifikanz ( $p < 0,09$ ) lag. Zusammengefasst deuten die Befunde darauf hin, dass Norrin über den kanonischen Wnt-Signalweg die IGF-1-Expression in HDMEC auf mRNA- und Proteinebene induziert.

Da Müllerzellen nicht nur an der retinalen Angiogenese beteiligt sind (Dorrell & Friedlander 2006), sondern auch Norrin exprimieren (Ye *et al.* 2009), wurde der Einfluss von Norrin auf die mRNA-Expression von IGF-1 ebenfalls an primären Müllerzellen aus der Ratte untersucht. Die Zellen wurden dafür einer 24-stündigen Inkubation mit 20 ng/ml bzw. 40 ng/ml rekombinantem humanem Norrin und/oder DKK-1 (100 ng/ml) unterzogen. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert. Zur Normierung der relativen Expression von IGF-1 wurde das Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) genutzt. Die Auswertung zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion der IGF-1-Expression durch Norrin (vgl. Abb. 34). Gegenüber der unbehandelten Kontrolle war der relative mRNA-Level für IGF-1 bei 20 ng/ml Norrin hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) um das  $2,4 \pm 0,1$ -fache und bei 40 ng/ml Norrin signifikant ( $p < 0,05$ ) um das  $1,5 \pm 0,2$ -fache gesteigert. Durch die Koinkubation mit dem Inhibitor DKK-1 (100 ng/ml) konnte die Erhöhung bei 20 ng/ml Norrin signifikant ( $p < 0,05$ ) auf das  $1,5 \pm 0,1$ -fache des Kontrollniveaus gesenkt werden. Somit konnte Norrin auch in Müllerzellen, über den kanonischen Wnt-Signalweg, die IGF-1-Expression induzieren.

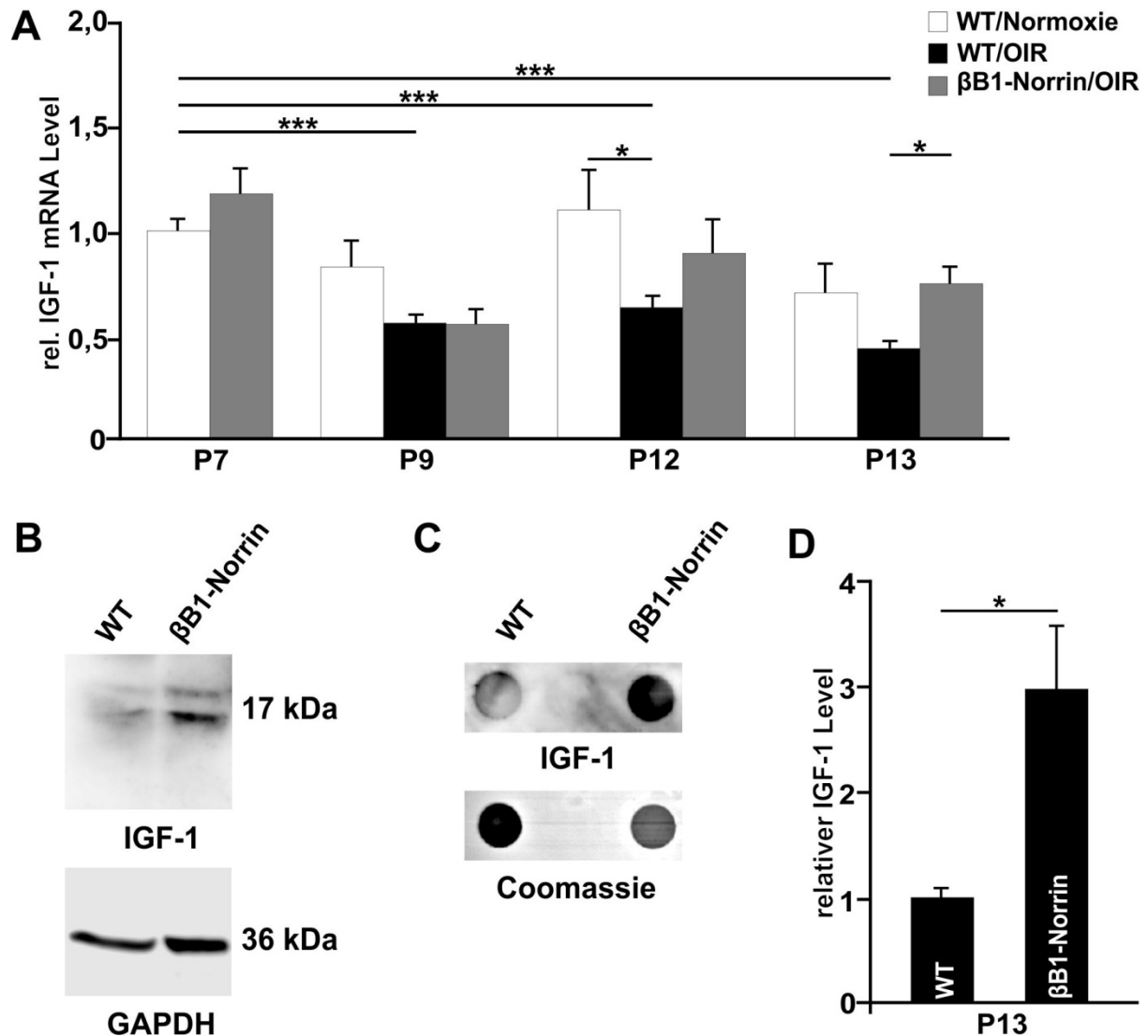


**Abb. 34: Norrin induziert die Expression von IGF-1 in Müllerzellen.**

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der IGF-1-mRNA-Expression in primären Müllerzellen aus der Ratte, nach 24-stündiger Inkubation mit DKK-1 (100 ng/ml) und/oder Norrin (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n > 3$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Nach Daten aus der Masterarbeit von Berna Sentürk. Die Isolation der primären Müllerzellen sowie die Anleitung des Experiments erfolgten durch den Autor.

#### 4.3.2 IGF-1-Expression während der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) unter dem Einfluss von Norrin

IGF-1 übernimmt sowohl in der vasoobliterativen Phase als auch bei der Neovaskularisierung der *Retinopathia praematurorum* (ROP) eine wichtige Rolle (Dorrell & Friedlander 2006; Heckmann 2008; Hellstrom *et al.* 2001). Bei der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR), einem Mausmodell der ROP (vgl. 1.2.4), fördert Norrin die Rekapillarisation und unterdrückt hierdurch die Bildung von präretinalen Neovaskularisationen (Ohlmann *et al.* 2010). Anhand von in vivo Experimenten sollte geklärt werden, inwieweit Norrin diese Eigenschaften über eine Induktion der IGF-1-Expression vermittelt. Hierfür wurde zunächst die IGF-1 mRNA-Expression von transgenen  $\beta$ B1-Norrin/FVB/N Mäusen, welche Norrin in der Linse ektopt überexprimieren, und wildtypischen FVB/N Wurfgeschwistern im OIR-Modell analysiert. Bei diesem Modell werden Mäuse, beginnend ab P7, für 5 Tage bei 75 % Sauerstoff gehalten. Augen der transgenen Mäuse und der Wildtypen wurden an P7, zu Beginn der Hyperoxie-Phase, an P9, während der Hyperoxie-Exposition, an P12, am Zeitpunkt der Rückkehr zur Normoxie sowie an P13, einen Tag nach der Hyperoxie, entnommen und die retinale RNA isoliert. Zusätzlich wurde auch die RNA aus der Retina von FVB/N Wildtypen gleichen Altersstufen, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, extrahiert. Die RNA aus den Retinae wurde mit Hilfe von quantitativen real-time RT-PCR Analysen auf die Expression von IGF-1 hin untersucht. Das Referenzgen GAPDH diente zur Normierung der dabei erhaltenen Daten. Bei FVB/N Wildtypen war die relative IGF-1-Expression auf mRNA-Ebene, während der Hyperoxie an P9 (um das  $0,6 \pm 0,05$ -fache), am Ende der 75-prozentigen Sauerstoffexposition an P12 (um das  $0,6 \pm 0,1$ -fache) und einen Tag nach der Hyperoxie-Phase an P13 (um das  $0,4 \pm 0,04$ -fache), höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber FVB/N Tieren, unter normoxischen Bedingungen an P7, reduziert (vgl. Abb. 35 A). An den untersuchten Zeitpunkten, zeigte die quantitative Betrachtung (vgl. Abb. 35 A) hingegen keine Veränderung in der relativen IGF-1-Expression von wildtypischen Mäusen, welche bei Normoxie gehalten wurden. An P12, fand sich in den Wildtypen mit Hyperoxie-Exposition, im Vergleich mit Wildtypen unter normoxischen Bedingungen, eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verringerung des relativen mRNA-Levels von IGF-1 um ca. 43 %.



**Abb. 35: Norrin erhöht die IGF-1-Expression nach einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie.**

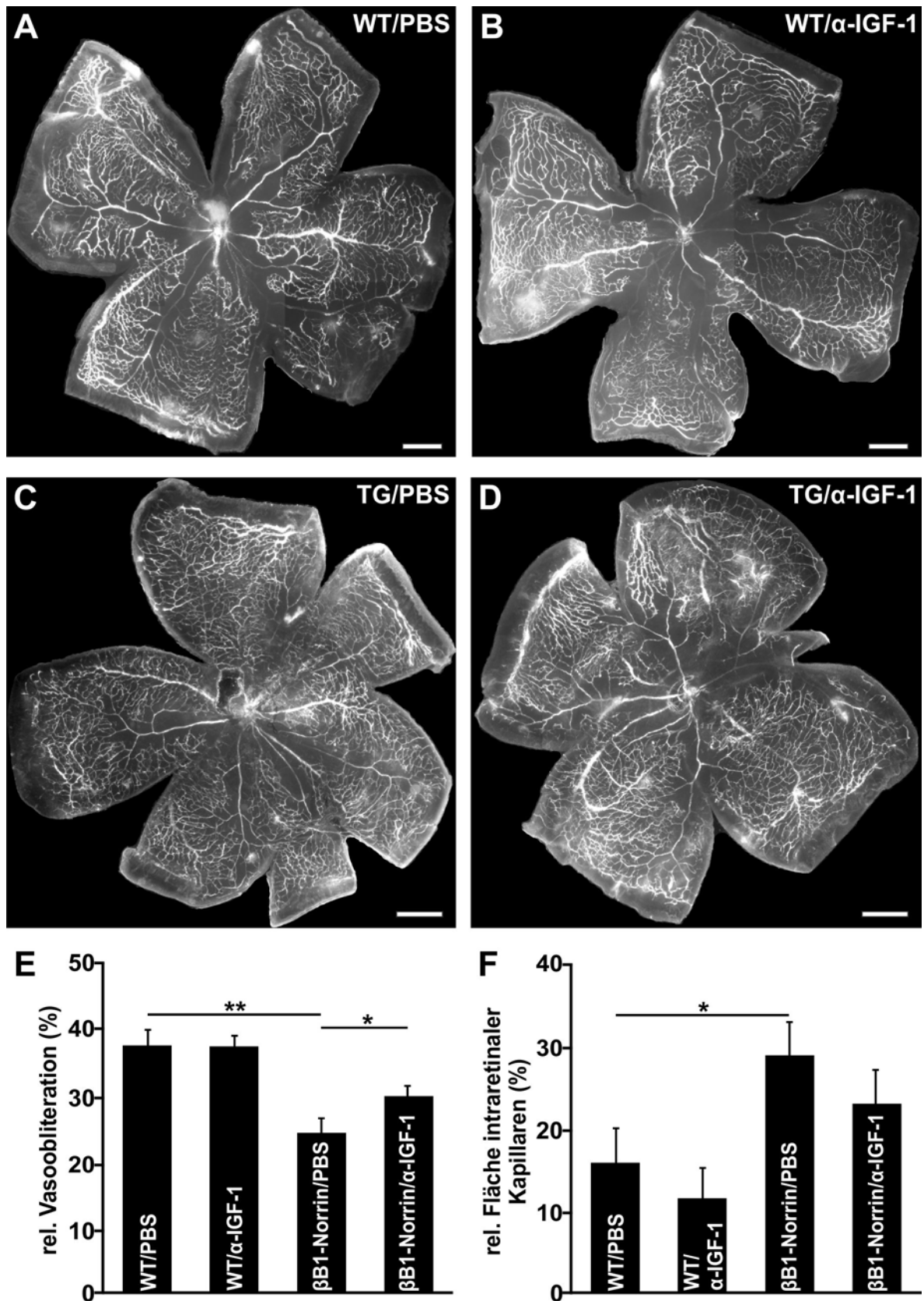
A: Quantitative real-time RT-PCR Analyse der IGF-1-mRNA-Expression in Netzhäuten von FVB/N Wildtypmäusen unter Normoxie, sowie βB1-Norrin/FVB/N Mäusen und deren Wildtypwurfgeschwistern, die zwischen P7 und P12 unter Hyperoxie (75 % Sauerstoff) gehalten wurden. Die Retinae wurden an P7, P9, P12 und P13 untersucht (Mittelwert ± SEM;  $n \geq 7$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; die experimentelle Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Berna Sentürk, die komplette Datenauswertung wurde vom Autor ausgeführt). B, C: Exemplarische Western Blot (B) und Dot Blot (C) Analysen der IGF-1 Proteinexpression in Netzhäuten von βB1-Norrin/FVB/N Mäusen und deren Wildtypgeschwistern an P13 nach 75-prozentiger Sauerstoffexposition zwischen P7 und P12. GAPDH (B) und die Coomassie-Färbung (C) wurden als Ladungskontrolle eingesetzt. D: Densitometrie der Dot Blot Analysen (Mittelwert ± SEM;  $n = 8$ ; \*  $p < 0,05$ ). B, C, D nach Daten aus der Masterarbeit von Berna Sentürk. Die Austestung des Antikörpers und die Anleitung der Experimente erfolgten durch den Autor.

Zwischen den transgenen βB1-Norrin Mäusen und den wildtypischen Wurfgeschwistern fand sich, an P7 sowie während und am Ende der Hyperoxie an P9 bzw. P12, keine differierende IGF-1-Expression. An P13, 24 Stunden nach Beendigung der Hyperoxie-Phase, war die relative IGF-1-Expression auf mRNA-Ebene in den transgenen Mäusen jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) um ca. 72 %, gegenüber den wild-

typischen Kontrolltieren, erhöht. Um festzustellen, ob sich dieser Befund auch in einer erhöhten IGF-1-Protein-expression äußert, wurde das retinale Gesamtprotein, von Wildtypen und transgenen Mäusen 24 Stunden nach Hyperoxie, in Dot Blot Analysen (vgl. Abb. 35 C) mit spezifischen (vgl. Abb. 35 B) Antikörpern gegen IGF-1 untersucht. Die densitometrische Auswertung ergab in den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ) der IGF-1-Expression auf das  $3,0 \pm 0,6$ -fache des wildtypischen Kontrollniveaus (vgl. Abb. 35 D). 24 Stunden nach der Hyperoxie-Exposition im OIR-Modell, induziert somit die transgene Überexpression von Norrin in  $\beta$ B1-Norrin Mäusen die IGF-1 Expression auf mRNA- und Proteinebene.

#### **4.3.3 Analyse der Rolle einer gesteigerten IGF-1-Expression bei der Norrin-induzierten Rekapillarisation nach OIR**

Nach 75-prozentiger Sauerstoffexposition im OIR-Modell induziert Norrin die Rekapillarisation vasoobliterierter Netzhautareale und die Formation intraretinaler Kapillaren (Ohlmann *et al.* 2010). Die Frage, ob die Norrin-induzierte IGF-1-Expression, 24 Stunden nach Ende der Hyperoxie-Phase (vgl. 4.3.2), an der Norrin-vermittelten Regeneration des Gefäßschadens im OIR-Modell beteiligt ist, sollte in diesem Versuchsabschnitt geklärt werden. Hierfür wurde transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern an P12, direkt im Anschluss an eine 5-tägige Hyperoxie-Exposition, intravitreal mit PBS (3  $\mu$ l, als Kontrolle) bzw. inhibitorischen Antikörpern gegen IGF-1 (3  $\mu$ l, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l, in das Partnerauge) injiziert. An P14, 2 Tage nach der Injektion, wurden die Tiere mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Dextran perfundiert. Die Augen wurden entnommen und retinale Häutchenpräparate fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei der mikroskopischen Betrachtung, der mit FITC-Dextran visualisierten retinalen Gefäße, zeigte sich in allen Proben eine zentrale, um die retinalen Arterien lokalisierte, vasoobliterierte Zone (vgl. Abb. 36 A-D). In den PBS-injizierten transgenen Augen (vgl. Abb. 36 C) erschien diese avaskuläre Zone deutlich kleiner als in den Augen von Wildtypen mit gleicher Injektion (vgl. Abb. 36 A). Bei der Quantifizierung der relativen Vasoobliteration (vgl. Abb. 36 E), welche dem prozentualen Anteil der vasoobliterierten Fläche am gesamten Areal des oberflächlichen Gefäßplexus entspricht, konnte dieser Unterschied bestätigt werden. In den transgenen Augen mit PBS-Injektion war die relative Vasoobliteration hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) um ca. 37 %, gegenüber gleich behandelten Wildtypen, verringert.



**Abb. 36: Norrin vermittelt die Rekapillarisation nach OIR teilweise über eine erhöhte IGF-1-Expression.**

A-D: Repräsentative retinale Häutchenpräparate von  $\beta$ B1-Norrin/FVB/N Mäusen (C, D) und Wildtypgeschwistern (A, B) nach Perfusion mit FITC-Dextran an P14. Den Tieren wurde zuvor, nach 5-tägiger Hyperoxie, an P12 spezifische anti-IGF-1 Antikörper (3  $\mu$ l, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l; B, D) bzw. PBS (Injektion in das Partnerauge; A, C) in den Glaskörper injiziert. Maßstabsbalken: A-D, 400  $\mu$ m. E, F: Quantifizierung der relativen Vasoobliteration (E) bzw. relativen Fläche intraretinaler Kapillaren (F) an P14, die den prozentualen Anteil der vasoobliterierten Fläche bzw. der Fläche der intraretinalen Kapillaren an der gesamten Fläche des oberflächlichen Plexus der Retina zeigt (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n \geq 6$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Die intravitreale Injektion von inhibitorischen Antikörpern gegen IGF-1 konnte diese Reduktion in den transgenen Tieren teilweise blockieren. Hierbei lag die relative Vasoobliteration mit ca. 21 % signifikant ( $p < 0,05$ ) über der von transgenen, mit PBS-injizierten Augen. In den Wildtypen konnte kein Unterschied, hinsichtlich des relativen vasoobliterierten Areals an P14, zwischen mit PBS bzw. inhibitorischen Antikörpern injizierten Augen ermittelt werden.

Zusätzlich zur Vasoobliteration wurden die Retinahäutchen auch hinsichtlich der Formation intraretinaler Kapillaren analysiert. Das Areal der tiefen Kapillaren wurde hierzu gemessen und zu der Fläche des oberflächlichen retinalen Plexus ins Verhältnis gesetzt (vgl. Abb. 36 F). Bei der Quantifizierung zeigten die transgenen, PBS-injizierten Augen eine um ca. 86 % signifikant ( $p < 0,05$ ) größere relative Fläche der intraretinalen Kapillaren als die wildtypischen, PBS-behandelten Augen. Für die Augen der  $\beta$ B1-Norrin Mäuse sowie der Wildtypgeschwister ergaben sich durch intravitreale Injektion von inhibitorischen Antikörpern gegen IGF-1, in der Gegenüberstellung zu den PBS-injizierten Partneraugen, keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend wird die Norrin-bedingte Revaskularisation der vasoobliterierten Areale im OIR-Modell, zumindest teilweise, über eine verstärkte IGF-1-Expression in den transgenen Mäusen vermittelt. Auf die Bildung tiefer retinaler Kapillaren scheinen die injizierten inhibitorischen Antikörper entweder keinen Einfluss zu haben oder IGF-1 ist an der Rekapillarisation der tiefen Netzhautanteile nicht beteiligt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der Einfluss von Norrin beim experimentellen Glaukom

Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Norrin-Überexpression in der inneren Retina beim Sekundärglaukom der DBA/2J Mäuse vor einem starken Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGC) schützt.

*In vivo* wurde eine neuroprotektive Wirkung von Norrin erstmals im Modell der NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schädigung von retinalen Ganglienzellen gezeigt (Seitz *et al.* 2010). Die intravitreale Injektion von rhNorrin konnte hierbei die retinalen Ganglienzellen von Mäusen vor NMDA-Schädigung schützen (Seitz *et al.* 2010). Vermittelt wurde dieser Effekt, zumindest partiell, über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs (Seitz *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte geklärt werden, ob auch eine chronische, transgene Überexpression von Norrin in der inneren Netzhaut eine neuroprotektive Wirkung auf eine chronische Degeneration von RGC entfaltet. Hierzu wurden zunächst drei, bereits vor Beginn dieser Arbeit generierte, unabhängige Pax6-Norrin Mauslinien auf die Expression von transgener Norrin-mRNA in der Retina untersucht. An P2 konnte nur in einer Pax6-Norrin Linie eine Expression des transgenen Norrins, unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancers des Pax6-Promotors, gefunden werden. Die weitere Charakterisierung dieser transgenen Mauslinie ergab einen Anstieg des  $\beta$ -Cateninlevels in der Retina. Außerdem wurde eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in den Kernen der retinalen Ganglienzellschicht und den Nuklei des inneren Teils der INL, also vornehmlich in den Kernen der Amakrinzellen, gefunden, was auf Grund der parakrinen Wirkung von Norrin (Ohlmann & Tamm 2012) für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der inneren Retina der Pax6-Norrin Mäuse spricht. Das transgene Expressionsmuster deckt sich mit den Daten einer von Marquardt *et al.* publizierten Analyse, bei der das gleiche Promotorkonstrukt zum Einsatz kam (Marquardt *et al.* 2001). Somit zeigen die Ergebnisse die erfolgreiche Etablierung eines transgenen Mausmodells mit einer Norrin-Überexpression in der inneren Netzhaut.

Eine aktuelle Arbeit unseres Lehrstuhls fand in transgenen Rpe65-Norrin Mäusen mit konstitutiver Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel und einer daraus

resultierenden Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in der gesamten Retina, eine normal ausgebildete Netzhaut mit allen Schichten (Braunger *et al.* 2013). Auch die Pax6-Norrin Mäuse zeigten eine normale Architektur der Retina und wiesen keine Auffälligkeiten in Gesamtdicke der Retina, der ONL und der INL auf. Darüber hinaus lag die Axonzahl in den Sehnerven dieser transgenen Mäuse auf dem Niveau von Wildtypwurfgeschwistern, was dafür spricht, dass auch in der Netzhaut die Anzahl der retinalen Ganglienzellen gleich ist. Dagegen konnten Ohlmann *et al.* in transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, mit ektopter Überexpression von Norrin in der Linse, eine größere Gesamtdicke der zentralen und peripheren Retina mit einer deutlich gesteigerten Anzahl an retinalen Ganglienzellen, im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen, finden (Ohlmann *et al.* 2005). Bei den Northern Blot Analysen der Pax6-Norrin Mäuse diente RNA aus der Linse von  $\beta$ B1-Norrin Mäusen als Kontrolle. Dabei zeigten die Proben aus den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen eine erheblich stärkere Expression von transgener Norrin-mRNA als die Pax6-Norrin 04 Mäuse (Daten nicht im Ergebnisteil gezeigt). Möglicherweise kann nur eine hohe Norrin-Konzentration, wie sie in den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen infolge der starken transgenen Überexpression vorliegt, das Wachstum retinaler Neuronen während der Entwicklung induzieren, welches mit einem Anstieg der Proliferation in der embryonalen Retina verknüpft zu sein scheint (Ohlmann *et al.* 2005). Der Startzeitpunkt der transgenen Expression kann hingegen als Ursache für die Wachstumsstimulation ausgeschlossen werden, da das Promotorkonstrukt der Pax6-Norrin Mäuse bereits 2 Tage vor dem  $\beta$ B1-Crystallin-Promotor, am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, aktiv ist (Duncan *et al.* 1996; Marquardt *et al.* 2001).

Da in Pax6-Norrin Mäusen sowohl die Retina als auch der *N. opticus* normal entwickelt war, konnte im NMDA-Schadenmodell, durch Vergleich von transgenen Mäusen mit deren wildtypischen Geschwistern, der Effekt der transgenen Überexpression von Norrin in der inneren Netzhaut auf eine akute NMDA-vermittelte exzitotoxische Schädigung retinaler Ganglienzellen unverfälscht untersucht werden. Bei einer Behandlung mit dem Glutamat-Analogon NMDA kommt es zur Aktivierung von ionotropen NMDA-Rezeptoren, der ein starker  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom folgt und schließlich durch oxidativen Stress zum Zelltod führt (Coxon *et al.* 2010). NMDA-Rezeptoren finden sich in retinalen Ganglien- und Amakrinzellen der inneren Retina (Slaughter 2010), ebendort wo die transgenen Pax6-Norrin Mäuse eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs aufweisen. Dennoch konnte 3 Wochen nach intravitrealer



Injektion von NMDA in den *Nn. optici* kein Unterschied in der Schädigung sowie der Axonzahl zwischen transgenen und wildtypischen Mäusen gefunden werden. Seitz *et al.* konnten hingegen bei intravitrealer Ko-Injektion von NMDA mit rhNorrin einen signifikanten Schutz von RGC vor apoptotischer Schädigung, im Vergleich zur NMDA-Injektion, zeigen (Seitz *et al.* 2010). Im Gegensatz zur kontinuierlichen transgenen Norrin-Überexpression auf einem relativ moderaten Niveau in den Pax6-Norrin Mäusen, kommt es bei diesem Versuchsansatz zu einer einmaligen hochkonzentrierten Gabe von rekombinantem Norrin. Anscheinend ist bei der NMDA-induzierten Apoptose von ca. 65 % der retinalen Ganglienzellen die Wirkung des transgenen Norrins in den Pax6-Norrin Mäusen zu gering, um einen neuroprotektiven Effekt zu entfalten.

Eine mögliche neuroprotektive Wirkung einer moderaten Norrin-Überexpression bei einer chronisch progredienten Degeneration von retinalen Ganglienzellen kann jedoch dadurch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde die Rolle der transgenen Überexpression von Norrin in den Pax6-Norrin Mäusen in einem Tiermodell für das Glaukom untersucht. Hierfür wurden die transgenen Mäuse durch Verpaarung vollständig aus dem FVB/N Hintergrund in den DBA/2J Hintergrund überführt. Wildtypische DBA/2J Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter ein Sekundärglaukom, wobei es nach Anstieg des intraokularen Drucks zu einem chronischen Verlust retinaler Ganglienzellen und letztlich zu degenerativen Veränderungen des *N. opticus* kommt (Libby *et al.* 2005a). Verantwortlich hierfür sind rezessive Mutationen in den Genen *Gpnmb* und im *Tyrp1*, welche eine Pigmentdispersion der Iris und eine Atrophie des Irisstromas auslösen (Anderson *et al.* 2002; Chang *et al.* 1999). Durch eine Ansammlung von Pigmentepithelzell-Abrieb in der Vorderkammer und die Verwachsungen von Iris und Hornhautrückfläche, kommt es zu einem Anstieg des Kammerwasserabflusswiderstandes, was sehr wahrscheinlich für den Anstieg des intraokularen Drucks in den DBA/2J Mäusen verantwortlich ist (John *et al.* 1998). Der anschließende Untergang der retinalen Ganglienzellen beginnt vermutlich mit der Schädigung von Axonen am Sehnervenkopf (Howell *et al.* 2007a). Im Vorfeld dieser Schädigung konnte eine Reduktion der Genexpression und des retrograden Transports in den retinalen Ganglienzellen von DBA/2J Mäusen gezeigt werden (Soto *et al.* 2008). Vor der Rückkreuzung mit DBA/2J Wildtypmäusen wurde der vordere Augenabschnitt von Pax6-Norrin/FVB/N Tieren untersucht. Die Iris, der Ziliarkörper sowie der Kammerwinkel mit Trabekelwerk und Schlemmkanal

waren in den transgenen Mäusen im Alter von 6 Wochen normal ausgebildet und unterschieden sich nicht von den Wildtypen. Somit war für Pax6-Norrin Mäuse im DBA/2J Hintergrund eine vergleichbare pathologische Veränderung des vorderen Augenabschnitts wie in den wildtypischen DBA/2J Tieren zu erwarten. Nach Rückkreuzung in den DBA/2J Hintergrund zeigten, im Alter von 8 Wochen, sowohl die transgenen Pax6-Norrin Mäuse als auch die Wildtypgeschwister im *N. opticus* eine nahezu identische Axonzahl. Mit ca. 50000 Axonen pro Sehnerv entspricht das Ergebnis in etwa dem Befund von Howell *et al.* für junge, präglaukomatöse DBA/2J Augen (Howell *et al.* 2007b).

Die Entwicklung des Augeninnendrucks der transgenen und wildtypischen Mäuse im DBA/2J Hintergrund wurde mit Hilfe der nichtinvasiven Applanationstonometrie untersucht, um die Tiere mehrfach messen zu können und hohe Tierzahlen zu vermeiden. Allerdings entwickeln DBA/2J Mäuse mit zunehmendem Alter Kalkablagerungen in der Cornea, wodurch nichtinvasive Messungen im Alter zwischen 9 und 12 Monaten beeinträchtigt sein können (Libby *et al.* 2005a). Die applanations-tonometrische Messung über 12 Monate ergab in den wildtypischen Geschwistern der Pax6-Norrin Mäuse einen hoch signifikanten Anstieg des Augeninnendrucks im Alter von 8, 9 und 10 Monaten, verglichen mit dem Ausgangswert nach 2 Monaten. Damit ähneln die Befunde dem intraokularen Druckprofil von DBA/2J Mäusen nach Libby *et al.*, bei welchem jedes Tier nur einmal invasiv gemessen wurde und sich in den meisten Tieren ein deutlicher Druckanstieg ab einem Alter von 8 bis 9 Monaten zeigte (Libby *et al.* 2005a). Etwas früher als in dieser Arbeit beschrieben, ging der intraokulare Druck in den untersuchten Wildtypen bereits ab einem Alter von 11 Monaten wieder zurück. Der grundsätzliche Verlauf des intraokularen Druckprofils in den transgenen Pax6-Norrin Mäusen ähnelte dem der wildtypischen Geschwistertiere. Im Gegensatz zu den Wildtypen war in den transgenen Mäusen jedoch der Druckanstieg im Vergleich zum Ausgangswert im Alter von 2 Monaten nicht signifikant. Darüber hinaus lag der Augeninnendruck in den Pax6-Norrin Mäusen nach 10 Monaten hoch signifikant unter dem der wildtypischen Geschwistertiere. Ein ähnlich verringerter Anstieg des Augeninnendrucks wie in den transgenen Tieren findet sich Alter von 9 und 10,5 Monaten auch in DBA/2J Mäusen mit einem Knockout von Bim bzw. Bax, beides proapoptotische Proteine der Bcl2-Familie (Harder *et al.* 2012; Libby *et al.* 2005b). In beiden Knockout-Mäusen konnte kein Einfluss auf die, für den DBA/2J Hintergrund typische, pathologische Irisveränderung gefunden werden, der

die Veränderungen des Augeninnendrucks erklären könnte. Als mögliche Ursache für den verringerten Druckanstieg wird die Apoptose von Trabekelwerkzellen diskutiert, welche jedoch nicht weiter untersucht ist (Harder *et al.* 2012; Libby *et al.* 2005b).

Um den Grund für die verringerte Erhöhung des intraokularen Drucks in Pax6-Norrin Mäusen genauer zu untersuchen, wurde der vordere Augenabschnitt nach von John *et al.* publizierten Kriterien beurteilt (John *et al.* 1998). Wie in dieser Veröffentlichung beschrieben, zeigten sowohl die Pax6-Norrin Mäuse als auch ihre wildtypischen Geschwister nach einem Jahr im vorderen Augensegment die typischen pathologische Veränderungen in unterschiedlich starker Ausprägung. Die Iris, der Kammerwinkel und der Ziliarkörper von 2-Monatstieren waren hingegen in beiden Gruppen normal ausgebildet. Im Alter von 12 Monaten war die Pigmentepithelatrophy der Iris in beiden Vergleichsgruppen überwiegend moderat und nur in einer Minderheit der Tiere stark ausgeprägt. Auch traten unterschiedliche Schweregrade von Ziliarkörperatrophien in Wildtypen und Transgenen in einem ähnlichen Verhältnis auf. Nach John *et al.* ist die Atrophie des Ziliarkörpers verantwortlich für den Rückgang des erhöhten Augeninnendrucks in alten DBA/2J Mäusen (John *et al.* 1998). Da sich moderat bis stark atrophisierte Ziliarkörper mehrheitlich in Pax6-Norrin Mäusen und den wildtypischen Tieren fanden, scheint der beobachtete Rückgang des Augeninnendruckanstiegs seine Ursache in der Schädigung des Ziliarkörpers zu haben. Im Vergleich zu den transgenen Mäusen traten in den Wildtypen mehr stark ausgebildete vordere Synechien auf. Dies könnte den stärkeren Druckanstieg in den wildtypischen Augen, durch eine stärkere Behinderung des Kammerwasserabflusses, erklären. Über die Art und Weise, wie die Überexpression von Norrin die Ausbildung von vorderen Synechien beeinflussen könnte, kann nur spekuliert werden.

Eine andere Erklärung für die Augeninnendruckveränderungen in den transgenen Tieren könnte mit der von Marquardt *et al.* beschriebenen, zusätzlichen Aktivität des verwendeten Promotorkonstrukts im Epithel der Iris und des Ziliarkörpers in Zusammenhang stehen (Marquardt *et al.* 2001). Da es sich bei Norrin um ein sekretiertes Protein handelt, könnte Norrin durch eine mögliche Überexpression im Iris- bzw. Ziliarepithel ins Kammerwasser gelangen und beim Kammerwasserabfluss eine Wirkung auf das Trabekelwerk des Kammerwinkels entfalten. Hierbei könnte zum einen der kanonische Wnt-Signalweg im Trabekelwerk durch Norrin aktiviert werden. Interessanterweise konnte in primären humanen Trabekelwerkzellen die

Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nachgewiesen und in Mäusen durch Inhibition des Signalwegs mittels exogenem DKK-1 der intraokulare Druck angehoben werden (Mao *et al.* 2012). Somit erscheint ein direkter Einfluss Norrins auf den Augeninnendruck durch eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Trabekelwerk, einem zentralen Element des Kammerwasserabflusssystems (Tekas & Lütjen-Drecoll 2009), plausibel. Zum anderen könnte auch die Eigenschaft Norrins, als Inhibitor des TGF- $\beta$ -Signalwegs fungieren zu können (Deng *et al.* 2013; Xu *et al.* 2012), eine wichtige Rolle spielen. So wird bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom häufig eine erhöhte Konzentration von TGF- $\beta$ 2 im Kammerwasser gefunden, welche im Verdacht steht, durch Veränderungen der extrazellulären Matrix des Trabekelwerks im Kammerwinkel einen erhöhten Kammerwasserabflusswiderstand zu induzieren und den Augeninnendruck zu erhöhen (Tamm & Fuchshofer 2007). Möglicherweise kann die Hemmung von TGF- $\beta$ 2 durch transgenes Norrin pathologische Veränderungen im Trabekelwerk von DBA/2J Mäusen unterbinden und so einen starken Anstieg des intraokularen Drucks verhindern. Um ein mögliches Einwirken des transgenen Norrins auf das Trabekelwerk zu untersuchen, sollte zunächst die Expression von Norrin und die damit verbundene Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Epithel der Iris und des Ziliarkörpers immunhistologisch untersucht werden. Darüber hinaus sollte auch im Trabekelwerk die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs immunhistologisch analysiert werden. Eine elektronenmikroskopische Analyse des Trabekelwerks von Pax6-Norrin Mäusen könnte zudem Hinweise auf Veränderungen in der extrazellulären Matrix liefern. Die elektronenmikroskopische als auch die immunhistologische Analyse war im Rahmen dieser Arbeit auf Grund der zeitintensiven Rückkreuzung der Pax6-Norrin Mäuse in den DBA/2J Hintergrund und der späten Entwicklung der glaukomatösen Veränderungen nicht mehr möglich.

Die lokale Invasion von Zellen aus der äußeren Körnerschicht in den subretinalen Spalt, die sich teilweise in den Pax6-Norrin Mäusen und den wildtypischen Geschwistern im DBA/2J Hintergrund fand, wurde von John *et al.* in ihrer Analyse der Retinae von DBA/2J Mäusen nicht beschrieben (John *et al.* 1998). Darüber hinaus ähnelt diese Netzhautanomalie weder der bekannten Rd4 („Retinal degeneration 4“)-Mutation noch anderen gängigen Mutationen, die eine Degeneration der Netzhaut zur Folge haben (Chang *et al.* 2002). Der Grund der lokalen Veränderung in der Netzhaut, welche Wildtypen und Transgene in einem ähnlichen Umfang betrifft, ist

somit unklar. Nachdem die Existenz der lokalen Anomalien in beiden Vergleichsgruppen nicht mit der Stärke der glaukomatösen Veränderungen korreliert, scheint diese retinale Besonderheit die Analyse der Rolle von Norrin im DBA/2J-Sekundärglaukom jedoch nicht zu beeinträchtigen.

Die Schädigung der Sehnerven in Pax6-Norrin Mäusen und den Wildtypgeschwistern nach 12 Monaten wurde anhand eines etablierten Bewertungsmusters (Anderson *et al.* 2005; Libby *et al.* 2005c) analysiert. Dabei unterschied man ein mildes, ein moderates und ein starkes Schadensniveau. Bei den Wildtypen ergab sich in 40 % der *Nn. optici* eine starke Schädigung. In einer groß angelegten Studie von Libby *et al.* wurde in ein Jahr alten DBA/2J Mäusen ein höherer Prozentsatz von Sehnerven mit starker Schädigung gefunden (Libby *et al.* 2005a). Der Unterschied zu diesen Ergebnissen lässt sich womöglich durch die relativ geringe Anzahl an untersuchten Wildtypen und dem variablen zeitlichen Fortschreiten der glaukomatösen Schädigung im DBA/2J Hintergrund (Libby *et al.* 2005a) erklären. Im Gegensatz zu den wildtypischen Geschwistern zeigten die *Nn. optici* der Pax6-Norrin Mäuse zwar ebenfalls milde und moderate, aber keine schwere Schädigung. Auch die mittlere Axonzahl war in den transgenen Sehnerven, verglichen mit der der Wildtypen, erhöht. Um jedoch eine verlässliche Aussage über die statistische Signifikanz dieses Befundes treffen zu können, müssten, wegen des variablen zeitlichen Verlaufs der glaukomatösen Schädigung (Libby *et al.* 2005a), deutlich mehr Mäuse beider Vergleichsgruppen ausgewertet werden. Der zeitliche Rahmen dieser Doktorarbeit ließ die Untersuchung einer größeren Tierzahl jedoch nicht zu. Trotzdem deuten die vorläufigen Daten daraufhin, dass die intraretinale Norrin-Überexpression vor dem Verlust von RGC und somit auch deren retinaler Axone schützt und eine schwere glaukomatöse Schädigung des *N. opticus* verhindert.

Vergleicht man die Ergebnisse mit Daten von Bax-defizienten DBA/2J Mäusen, so scheint die schützende Wirkung, nur in einem sehr geringen Maße, durch den verringerten Anstieg des intraokularen Drucks in den Pax6-Norrin Mäusen erklärbar zu sein. Bax-Knockout-Mäuse zeigen ebenfalls, wie oben erwähnt, einen reduzierten Druckanstieg, weisen aber, anders als die Pax6-Norrin Mäuse, nur geringfügig weniger schwer geschädigte *Nn. optici* als wildtypische DBA/2J Mäuse auf (Libby *et al.* 2005b). Die protektive Wirkung der Norrin-Überexpression gegen eine schwerwiegende Sehnervenschädigung scheint folglich eine andere Ursache zu haben.

Denkbar wäre, dass Norrin seine schützende Eigenschaft im DBA/2J Hintergrund nach einem ähnlichen Mechanismus vermittelt, wie er für die neuroprotektive Wirkung von Norrin im NMDA-Schadensmodell diskutiert wird. Wie bereits beschrieben, schützt eine intravitreale Verabreichung von rhNorrin retinale Ganglienzellen der Maus vor NMDA-induzierter exzitotoxischer Schädigung, wobei die Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eine entscheidende Rolle spielt (Seitz *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Norrin, bei NMDA-vermittelter Schädigung, die Expression von Lif („Leukemia inhibitory factor“) und Edn2 („Endothelin 2“), aber auch von neurotrophen Wachstumsfaktoren wie Bdnf („Brain-derived neurotrophic factor“) oder Fgf2 („Fibroblast growth factor 2“), in der Retina steigert (Seitz *et al.* 2010). In primären Müllerzellen konnte durch Norrin zudem die Expression von Lif und neurotrophen Wachstumsfaktoren wie Fgf2 signifikant induziert werden (Seitz *et al.* 2010). Basierend auf diesen Daten sowie auf Arbeiten, welche die Degeneration von Photorezeptoren untersuchten (Joly *et al.* 2008; Rattner & Nathans 2005), wurde ein hypothetisches Modell für den neuroprotektiven Wirkungsmechanismus von Norrin entworfen. Hiernach bilden die Müllerzellen, durch Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, bei neuronaler Schädigung vermehrt Lif, was retinale Ganglienzellen oder Photorezeptoren zu einer gesteigerten Sekretion von Edn2 anregt und in der Folge die Müllerzellen aktiviert, welche ihrerseits, zusätzlich stimuliert durch Norrin, in einem erhöhten Maße neurotrophe Wachstumsfaktoren wie Fgf2 exprimieren (Ohlmann & Tamm 2012; Seitz *et al.* 2010). Interessanterweise ist die Expression von Edn2 in der Netzhaut und dem Sehnervenkopf von DBA/2J Mäusen, im frühen Stadium der glaukomatösen Veränderung, vermehrt exprimiert (Howell *et al.* 2011). Die Schädigung retinaler Ganglienzellen im DBA/2J Hintergrund beruht sehr wahrscheinlich nicht auf NMDA-Rezeptor-vermittelter Exzitotoxizität (Libby *et al.* 2005b). Eine gesteigerte Edn2-Expression findet sich aber dennoch auch bei NMDA-vermittelter Schädigung retinaler Ganglienzellen, welche durch Norrin noch zusätzlich verstärkt wird (Seitz *et al.* 2010). Edn2 könnte somit ein generelles Stresssignal retinaler Nervenzellen sein, um die Bildung neurotropher Faktoren anzuregen (Ohlmann & Tamm 2012). Homolog zur Schädigung im NMDA-Modell, könnte Norrin auch beim DBA/2J-Sekundärglaukom durch die zusätzliche Steigerung der Edn2-Expression vermehrt zur Bildung neurotropher Faktoren beitragen und so protektiv wirken. In einer aktuellen Studie an transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Norrin im retinalen Pigmentepithel (Rpe65-Norrin)

konnte zudem demonstriert werden, dass Norrin über Aktivierung des Norrin/ $\beta$ -Catenin- und des Edn2-Signalwegs die Apoptose von Photorezeptoren durch einen Lichtschaden verhindert (Braunger *et al.* 2013). Ein erhöhter pAkt-Spiegel deutet außerdem darauf hin, dass bei diesem Prozess das vermehrt gebildete Bdnf den PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt-Signalweg aktiviert (Braunger *et al.* 2013).

Um den Wirkmechanismus von Norrin im DBA/2J-Mausmodell zu analysieren sollte daher die Expression der Faktoren, die im Vorhergehenden als relevant für die neuroprotektive Wirkung von Norrin diskutiert wurden, untersucht werden. Hierbei könnten bereits adulte Pax6-Norrin Mäuse im DBA/2J Hintergrund vor dem Auftreten der glaukomatösen Schädigung erste Hinweise liefern. So konnte zum Beispiel von Seitz *et al.* auch ohne exzitotoxische Schädigung retinaler Ganglienzellen, allein infolge einer intravitrealen Injektion von Norrin, eine gesteigerte FGF-2-Expression in der murinen Retina gezeigt werden (Seitz *et al.* 2010). Ein bisher, im Zusammenhang mit der neuroprotektiven Wirkung von Norrin bei der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität und beim Lichtschaden, nicht diskutierter Faktor ist Bim, ein proapoptotisches Protein der Bcl2-Familie (O'Connor *et al.* 1998). Im DBA/2J-Mausmodell könnte Norrin seine schützende Wirkung möglicherweise auch über die Regulation von Bim vermitteln. Wie bereits erwähnt, erinnert das intraokulare Druckprofil von Bim-defizienten DBA/2J Mäusen an das von Pax6-Norrin Tieren (Harder *et al.* 2012). Darüber hinaus wurden bei Bim-Knockout-Mäusen im DBA/2J Hintergrund schwer geschädigte *Nn. optici* nach einem Jahr zwar gefunden, wobei die Zahl derart betroffener Sehnerven jedoch signifikant unter der von Wildtypen lag (Harder *et al.* 2012), und somit auch wieder den an Pax6-Norrin Mäusen gemachten Befunden ähnelt. Bemerkenswerterweise konnten in Bim-defizienten Mäusen, im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, auch Ähnlichkeiten mit den Norrin-überexprimierenden  $\beta$ B1-Norrin Mäusen aufgedeckt werden (Ohlmann *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011). Exemplarisch sei hier die Unterdrückung der pathologischen Neovaskularisierung in den Retinae beider Mauslinien genannt (Ohlmann *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Bim nicht nur proapoptotisch wirkt, sondern auch die Migration von Endothelzellen beeinflusst (Grutzmacher *et al.* 2010). Bim spielt also, wie Norrin, auch bei der Regulation der retinalen Angiogenese eine Rolle. Aus den genannten Gründen erscheint es sinnvoll, auch die Expression von Bim in Pax6-Norrin Mäusen im DBA/2J Hintergrund eingehender zu überprüfen.

Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass die intraretinale Norrin-Überexpression eine schwere glaukomatöse Schädigung des *N. opticus* verhindert. Somit scheint Norrin seine neuroprotektive Wirkung nicht nur bei der NMDA-vermittelten Schädigung retinaler Ganglienzellen und der lichtinduzierten Apoptose von Photorezeptoren, sondern auch bei einer chronischen Schädigung von RGC im DBA/2J-Sekundärglaukom zu entfalten.

## **5.2 Die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bei der Rekapillarisation nach einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie**

Nach den erhobenen Daten induziert LiCl *in vitro* angiogene Eigenschaften in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) über den kanonischen Signalweg. *In vivo* konnte eine angiogene Wirkung von LiCl im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR) hingegen nicht nachgewiesen werden.

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Norrin angiogene Effekte *in vitro* und *in vivo* über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt (Ohlmann *et al.* 2010). In *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sollte daher der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg durch LiCl und SB216763, beides Inhibitoren der GSK-3 $\beta$ , aktiviert werden, um festzustellen, ob eine generelle Stimulation des kanonischen Signalwegs Norrin-ähnliche angiogene Wirkungen erzielt.

Wie für Norrin an humanen retinalen mikrovaskulären Endothelzellen (HRMEC) beschrieben (Ohlmann *et al.* 2010), konnte auch bei LiCl- bzw. SB216763-Inkubation in HDMEC ein konzentrationsabhängiger Anstieg des  $\beta$ -Cateninlevels und die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs beobachtet werden.

Um hieraus resultierende angiogene Eigenschaften zu untersuchen, wurden, analog zu Ohlmann *et al.*, die Proliferation, die Viabilität und die Migration analysiert (Ohlmann *et al.* 2010), welche gängige Parameter der Angiogeneseforschung darstellen (Staton *et al.* 2004). Die Proliferation der HDMEC konnte sowohl durch LiCl als auch SB216763 induziert werden und deckt sich mit Daten von Norrin an HRMEC (Ohlmann *et al.* 2010). Da der Effekt der GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren auf die Proliferation die gleiche Konzentrationsabhängigkeit wie die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zeigte, spricht dies zusammen mit der beobachteten Blockierung der LiCl-induzierten Proliferation durch Quercetin, einem Inhibitor der  $\beta$ -Catenin/TCF-ver-



mittelten transkriptionellen Regulation (Park *et al.* 2005), für eine über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelte Proliferationssteigerung. Entsprechend konnte auch in einer Studie an mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn von C57BL/6 Mäusen über die Inhibition der GSK-3 $\beta$  die Zellproliferation, in Verbindung mit einer Reduktion der  $\beta$ -Catenin-Degradation, steigern (Li *et al.* 2011).

Die Viabilität der HDMEC konnte durch LiCl- und SB216763-Behandlung induziert werden, was Befunden für Norrin an HRMEC gleicht (Ohlmann *et al.* 2010). Auch konnte in einer früheren Arbeit ein positiver Effekt von LiCl und SB216763 auf die Viabilität von humanen Nabelvenen-Endothelzellen nachgewiesen werden (Choi *et al.* 2007). Die Konzentrationsabhängigkeit der HDMEC-Proliferation bei LiCl spricht, wie schon bei der Proliferation, für eine Vermittlung des Effekts über den kanonischen Wnt-Signalwegs. Bei SB216763 war die Wirkung nicht von der Konzentration abhängig und schwächer ausgeprägt. Eine Begründung hierfür könnte in der Eigenschaft von SB216763 zu finden sein, neben der GSK-3 $\beta$  auch einige andere Kinasen, wie z. B. Cyclin-abhängige Kinasen, zu inhibieren (Cohen & Goedert 2004). Somit könnte die Zellviabilität durch SB216763 nicht nur über den kanonischen Wnt-Signalweg, sondern auch über andere Wege beeinflusst sein.

Bei der Untersuchung der HDMEC-Migration fand sich, analog zu Daten für Norrin (Ohlmann *et al.* 2010), eine konzentrationsabhängige Induktion durch LiCl.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass LiCl und SB216763 proangiogen auf HDMEC wirken. Hierbei ähnelt gerade die angiogene Eigenschaft von LiCl *in vitro* sehr dem für Norrin beschriebenen Effekt (Ohlmann *et al.* 2010). Anhand der Daten scheint die angiogene Wirkung der GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt zu werden. Somit sind die *in vitro*-Ergebnisse für LiCl und SB216763 im Einklang mit den Befunden aktueller Studien, welche Wnt/ $\beta$ -Catenin-vermittelte angiogene Effekte auf mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* zeigen konnten (Reis & Liebner 2013).

Für die *in vivo* Versuche lag der Fokus auf der angiogenen Wirkung von LiCl. Bei Lithium handelt es sich um ein zugelassenes Medikament, das seit langem zur Behandlung bipolarer Störungen eingesetzt wird (Cade 1949; Cohen & Goedert 2004). In FVB/N Mäusen konnte durch LiCl-Behandlung nach Hyperoxie-Exposition im OIR-Modell der  $\beta$ -Cateninlevel in der Retina erhöht werden. Die intravitreale LiCl-Injektion konnte dabei  $\beta$ -Catenin stärker induzieren als die intraperitoneale Verabreichung und den kanonischen Signalweg in der INL, besonders im Bereich der Amakrinzellen,

aktivieren. Allerdings konnte weder die intravitreale noch intraperitoneale Gabe von LiCl nach Hyperoxie die Rekapillarisation der vasoobliterierten, hypoxischen Areale stimulieren.

Dies steht im Gegensatz zu vorangegangenen Publikationen. So konnte nach einem Myokardinfarkt durch Lithiumbehandlung die Viabilität von Endothelzellen gesteigert werden und in Periinfarkt-Arealen eine erhöhte Kapillardichte beobachtet werden (Kaga *et al.* 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass im Gehirn nach einer mittleren zerebralen Arterienokklusion eine tägliche Verabreichung von Lithium für 2 Wochen eine Neuformation von Gefäßen in Periinfarkt-Arealen induziert (Kim *et al.* 2008). Auch für Norrin ist eine ähnliche angiogene Wirkung beschrieben. Eine Studie an  $\beta$ B1-Norrin Mäusen mit einer ektopen Überexpression von Norrin fand im OIR-Modell eine gesteigerte Rekapillarisation vasoobliterierter Areale und eine Unterdrückung der pathologischen Neovaskularisation (Ohlmann *et al.* 2010). Diese Effekte von Norrin schienen dabei von der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs abhängig zu sein (Ohlmann *et al.* 2010). Auch durch eine intravitreale Injektion von Norrin an P14 konnte im OIR-Modell eine Reduktion des avaskulären Areals und der pathologischen Neovaskularisation in der Netzhaut erzielt werden, was wiederum durch die zusätzliche Injektion von DKK-1, einem Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, blockiert werden konnte (Tokunaga *et al.* 2013). Ebenfalls im OIR-Modell wurde gezeigt, dass eine Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs durch eine intraperitoneale Gabe von Antikörpern gegen Frizzled4 nach der Hyperoxie-Phase die physiologische Revaskularisation reduziert (Paes *et al.* 2011). Überdies konnte bei *Lrp5* („Low density lipoprotein receptor-related protein 5“; Teil des Norrin/Wnt-Rezeptorkomplexes)- bzw. *Dvl2* („Dishevelled2“; beteiligt an Norrin/Wnt-Signaltransduktion)-Knockout-Mäusen im OIR-Modell ein vermindertes Ausmaß an pathologischer Neovaskularisation gefunden werden (Chen *et al.* 2011). Die genannten Publikationen für Lithium, außerhalb des Auges, sowie für Norrin, in der Retina, lassen somit darauf schließen, dass der kanonische Wnt-Signalweg für eine physiologische Revaskularisation hypoxischer Areale von entscheidender Bedeutung ist.

Ein möglicher Grund, warum die intravitreale LiCl-Injektion diese Wirkung im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie nicht erzielt, könnte die zellspezifische Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch LiCl entlang eines Konzentrationsgradienten von der inneren zur äußeren Retina sein. Im Gegensatz

hierzu bindet Norrin spezifisch an den Frizzled4-Rezeptor (Xu *et al.* 2004), wobei die daraus resultierende Aktivierung des Norrin/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zusätzlich durch Tspan12 verstärkt wird (Junge *et al.* 2009). Tspan12 fördert nur den Norrin/ $\beta$ -Catenin- und nicht den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Junge *et al.* 2009). Außerdem wird Tspan12 in der Netzhaut ausschließlich in den retinalen Gefäßen exprimiert und es wird diskutiert, dass nur ein Teil der Frizzled4-exprimierenden Zellen der Retina auf Norrin reagiert (Junge *et al.* 2009). Diese Zellspezifität fehlt bei der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch LiCl und könnte so eine von Norrin abweichende Wirkung bei der Rekapillarisation vasoobliterierter Bereiche erklären.

Des Weiteren kann Lithium in Neuronen die Signalübertragung und die Neurotransmitterausschüttung durch Störung der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase modulieren (Phiel & Klein 2001). So konnten durch klinisch relevante Lithiumkonzentrationen kortikale Neuronen depolarisiert, die Hyperpolarisation nach ihrem Aktionspotential blockiert und deren Antwort auf synaptischen Input verändert werden (Butler-Munro *et al.* 2010). Über die Modifikation des Aktionspotentials könnte LiCl auch auf die Expression neuronaler Gene Einfluss nehmen (Fields *et al.* 1997). Darüber hinaus kann LiCl auf eine große Anzahl von Transkriptionsfaktoren und diverse intrazelluläre Signalwege einwirken, wobei insbesondere die GSK-3 $\beta$ , aber auch Enzyme wie die Inositol-Monophosphatase oder die Histon-Deacetylase durch Lithium inhibiert werden (Cohen & Goedert 2004; Phiel & Klein 2001; Wada 2009). Die GSK-3 $\beta$  kann ihrerseits die Proliferation, die Migration, die Apoptose, die Viabilität und die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen durch die Interaktion mit - bzw. die Modulation von - verschiedenen Transkriptionsfaktoren, metabolischen Enzymen, Mikrotubulin-assoziierten Proteinen und anderen Signalproteinen beeinflussen (Coghlan *et al.* 2000; Doble & Woodgett 2003; Grimes & Jope 2001). Die *in vitro* an mikrovaskulären Endothelzellen beobachtete Induktion angiogener Eigenschaften über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs könnte *in vivo* in der Retina durch eine zellunspezifische Lithium-vermittelte Stimulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und von weiteren, im Vorhergehenden beschrieben, Signalwegen konterkariert werden. Hierdurch könnte insbesondere die für die retinale Angiogenese entscheidende, konzertierte Signalübertragung zwischen retinalen Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen gestört und so eine angiogene Wirkung von LiCl im OIR-Modell verhindert werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine LiCl-Behandlung *in vitro* über die Aktivierung des kanonischen Wnt/Signalwegs proangiogen auf HDMEC wirkt. *In vivo* kann eine LiCl-Injektion jedoch die Rekapillarisation vasoobliterierter Areale nach einem Sauerstoff-induzierten Verlust retinaler Gefäße nicht induzieren.

### **5.3 Die Beteiligung der Norrin-vermittelten Induktion von IGF-1 an der retinalen Rekapillarisation nach OIR**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Stimulation der IGF-1-Expression durch Norrin *in vivo* und *in vitro*, welche über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs erfolgt. Auch für die protektiven Eigenschaften von Norrin gegen die Folgen einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie scheint die IGF-1-Induktion eine nennenswerte Relevanz zu besitzen.

IGF-1 ist bekannt als proangiogener Faktor, der bei der Entwicklung von retinalen Gefäßen, aber auch bei Erkrankungen mit pathologischer Angiogenese, wie der *Retinopathia praematurorum*, eine wichtige Rolle spielt (Hellstrom *et al.* 2001). Im Rahmen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte auf mRNA-Ebene eine Induktion der IGF-1-Expression in transgenen  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, welche eine ektope Überexpression von Norrin in der Linse besitzen, gefunden werden. Darauf aufbauend wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Norrin-induzierte IGF-1 Expression *in vitro* und *in vivo*, im OIR-Modell, untersucht.

*In vitro* konnten an HDMEC die mRNA-Expression und Sekretion von IGF-1 durch rhNorrin signifikant gesteigert werden. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen *in vitro* IGF-1 mRNA exprimieren und IGF-1 in das Medium sezernieren (Delafontaine *et al.* 1991). Die Induktion der IGF-1-Expression in HDMEC war abhängig von der eingesetzten rhNorrin-Konzentration und scheint über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vermittelt zu werden, wie Experimente mit dem Inhibitor DKK-1 nahelegen. Somit erfolgt die IGF-1-Induktion durch rhNorrin in HDMEC über den gleichen Signalweg, der auch an der angiogenen Wirkung von rhNorrin auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen beteiligt ist (Ohlmann *et al.* 2010).

Müllerzellen sind vermutlich die hauptsächliche Quelle für Norrin in der Retina (Ye *et al.* 2009). *In vitro* konnte in primären Müllerzellen der Ratte durch rhNorrin-Inkubation der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert werden (Seitz *et al.* 2010). Sato *et al.* konn-

ten in eben diesen Zellen zeigen, dass die Transkription von IGF-1 durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch L-Typ-Calciumkanäle gesteigert werden kann (Sato *et al.* 2008). Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit verweisen auf eine konzentrationsabhängige Induktion der IGF-1-mRNA-Expression in Müllerzellen der Ratte durch rhNorrin, die von der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs abhängig zu sein scheint. Somit konnte bei beiden untersuchten Zelltypen, welche bei der retinalen Angiogenese essentiell beteiligt sind (Dorrell & Friedlander 2006), eine Induktion von IGF-1 durch Norrin *in vitro* beobachtet werden.

Die Analyse von FVB/N Mäusen bei Normoxie ergab zwischen P7 und P13 eine gleichbleibende IGF-1-mRNA-Expression. Dies deckt sich mit einer Publikation von Lofqvist *et al.*, die in C57BL/6 Mäusen während der normalen Entwicklung der retinalen Gefäße zwischen P7 und P17 ebenfalls keine veränderte IGF-1-mRNA-Expression fanden (Lofqvist *et al.* 2009). Im Gegensatz zu dieser Arbeit war die IGF-1-Expression in FVB/N Mäusen im Verlauf des OIR-Modells nicht wie bei Lofqvist *et al.* unverändert, sondern war kurz nach Beginn der Hyperoxie-Exposition (P7-P12) höchst signifikant reduziert im Vergleich zu P7 reduziert und blieb bis P13 auf diesem niedrigen Niveau. Bei der Analyse im OIR-Modell glich in den transgenen  $\beta\text{B1-Norrin/FVB/N}$  Wurfgeschwistern der - zuvor erwähnten - FVB/N Mäuse die IGF-1-Expression an P12 der von FVB/N Mäusen bei Normoxie. Hingegen war der relative IGF-1-mRNA-Level ihrer wildtypischen Geschwister im OIR-Modell signifikant, im Vergleich zu Wildtypen an Raumluft, verringert. Die Ursache hierfür könnte die von Ohlmann *et al.* für FVB/N Mäuse im OIR-Modell beschriebene, gegenüber Geschwistertieren bei Normoxie, signifikant reduzierte Norrin-Expression an P12 sein (Ohlmann *et al.* 2010). Durch die ektope, transgene Norrin-Überexpression in der Linse scheint die IGF-1-Expression im OIR-Modell an P12 in etwa auf dem physiologischen Niveau von Wildtypen bei Normoxie gehalten zu werden. Wie die beobachteten Befunde nahelegen, ist dies auch an P13 der Fall. Im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern war an P13, 24 Stunden nach Ende der 5-tägigen Hyperoxie-Phase, in den transgenen  $\beta\text{B1-Norrin}$  Mäusen die IGF-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene signifikant induziert. Die Daten zeigen, dass die transgene Norrin-Überexpression *in vivo* im OIR-Modell in der Lage ist, IGF-1 an einem Zeitpunkt zu stimulieren, bei dem durch die Rückkehr der Mäuse an die Raumluft zentrale vasoobliterierte Areale der Retina hypoxisch werden (Stahl *et al.* 2010). In

den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen wird die anatomisch korrekte Rekapillarisation dieser Netzhautabschnitte durch Norrin gefördert (Ohlmann *et al.* 2010).

Um zu analysieren, ob die beobachtete IGF-1-Induktion an dieser Norrin-vermittelten Regeneration des Gefäßschadens beteiligt ist, wurden den Mäusen nach der Hyperoxie-Exposition inhibitorische Antikörper gegen IGF-1 intravitreal injiziert. In PBS-behandelten Kontrollaugen wurde an P14, wie von Ohlmann *et al.* beschrieben (Ohlmann *et al.* 2010), eine verstärkte Rekapillarisation und die vermehrte Bildung intraretinaler Kapillaren in den Augen von  $\beta$ B1-Norrin Mäusen beobachtet. Durch die Gabe inhibitorischer Antikörper gegen IGF-1 konnte die Norrin-vermittelte Rekapillarisation signifikant verringert werden, was die Bedeutung der IGF-1-Induktion für diesen Prozess unterstreicht. Die Formation intraretinaler Gefäße konnte durch die Antikörper-Injektion in den  $\beta$ B1-Norrin Tieren hingegen nicht reduziert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies Folge eines, von der inneren zur äußeren Retina hin abfallenden, Konzentrationsgradienten der inhibitorischen Antikörper gegen IGF-1 ist. Um dies auszuschließen und zur genaueren Analyse der Beteiligung der IGF-1-Expression an der Norrin-vermittelten Regeneration der Gefäßschädigung im OIR-Modell, könnten Mäuse mit einem Tamoxifen-induzierbaren konditionellen Knockout von IGF-1 in Endothelzellen (Tie2 („Endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2“ - oder PDGFB („Platelet-derived growth factor  $\beta$ “)-Promotor) oder Müllerzellen (Glast („Glutamate aspartate transporter“) -Promotor) untersucht werden. Dennoch zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die protektiven angiogenen Eigenschaften von Norrin im OIR-Modell zumindest zum Teil über die Induktion von IGF-1 erfolgen.

Die Retina ist Teil des zentralen Nervensystems. Insofern ist es bemerkenswert, dass auch im sich entwickelnden und adulten Gehirn IGF-1 die Angiogenese fördert und basierend auf zahlreichen Studien eine IGF-1-Induktion, vermittelt über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Inhibition der GSK-3 $\beta$ , diskutiert wird (Wada 2009). Parallel hierzu scheint Norrin in der Retina in der Lage zu sein, über Stimulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs IGF-1 zu induzieren und zumindest auf die Rekapillarisation im OIR-Modell einzuwirken.

IGF-1 kann die VEGF-vermittelte Proliferation von retinalen Endothelzellen, die über den MAPK („Mitogen-activated protein kinase“)-Signalweg erfolgt, verstärken (Hellstrom *et al.* 2001; Smith *et al.* 1999). Außerdem konnte an Endothelzellen aus der Retina nachgewiesen werden, dass ein niedriger IGF-1-Spiegel die VEGF-indu-

zierte Akt-Phosphorylierung unterbindet und so das Überleben von Endothelzellen negativ reguliert (Hellstrom *et al.* 2001). IGF-1 hat also permissive Eigenschaften im Bezug auf die angiogene Wirkung von VEGF. In der hypoxischen Phase der Sauerstoff-induzierten Retinopathie kommt es zu einem Anstieg von VEGF (Stahl *et al.* 2010). Durch den Norrin-induzierten IGF-1-Anstieg könnte VEGF schneller als in wildtypischen Mäusen in die Lage versetzt werden, die Rekapillarisation zu stimulieren und so die Hypoxie zu reduzieren. Dies könnte möglicherweise eine starke VEGF-Expression in der Retina vermeiden, die im OIR-Modell zur pathologischen Neovaskularisation beiträgt (Stahl *et al.* 2010). Interessanterweise ist in den  $\beta$ B1-Norrin Mäusen diese Neovaskularisation unterdrückt (Ohlmann *et al.* 2010). Das Fehlen einer Norrin-vermittelten IGF-1-Induktion könnte möglicherweise auch zum Teil erklären, warum in Norrin-Knockout Mäusen der oberflächliche retinale Plexus unvollständig ausgebildet ist und die intraretinalen Plexus fehlen (Richter *et al.* 1998), obwohl ein Überfluss von VEGF und VEGFR2 („Vascular endothelial growth factor receptor 2“) in der inneren Retina vorhanden ist (Wang *et al.* 2012).

Die Norrin-vermittelte IGF-1-Induktion im OIR-Modell könnte zudem mit einer Reduktion der Bim-Expression verknüpft sein. Bim ist ein proapoptotisches Protein der Bcl2-Familie (O'Connor *et al.* 1998). Allerdings wirkt Bim nicht nur proapoptotisch, sondern beeinflusst auch die Migration von Endothelzellen (Grutzmacher *et al.* 2010). Für granuläre zerebelläre Neurone wurde gezeigt, dass IGF-1 die Expression von Bim blockiert (Linseman *et al.* 2002). Bemerkenswerterweise konnten in Bim-defizienten Mäusen, im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, auch Gemeinsamkeiten mit den Norrin-überexprimierenden  $\beta$ B1-Norrin Mäusen, wie die Unterdrückung der pathologischen Neovaskularisierung, aufgedeckt werden (Ohlmann *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011). Auch erscheint eine Norrin-vermittelte Modulation von Bim im Zusammenhang mit der neuroprotektiven Wirkung von Norrin beim DBA/2J-Sekundärglaukom plausibel (vgl. 5.1). Aus diesen Gründen könnte es sinnvoll sein, die Bim-Expression von  $\beta$ B1-Norrin Mäusen im OIR-Modell zu untersuchen.

Insgesamt lässt sich anhand der gewonnen Daten schlussfolgern, dass Norrin *in vitro* und *in vivo* in der Lage ist, durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die IGF-1-Expression zu induzieren. Bei der protektiven Wirkung von Norrin im OIR-Modell, die ebenfalls auf der Stimulation dieses Signalwegs beruht, scheint dies zu-

mindest für die Rekapillarisation der vasoobliterierten Areale von entscheidender Bedeutung zu sein.



## 6 Zusammenfassung

Norrin ist ein sekretiertes Signalprotein, das in der Retina über neuroprotektives und angiogenes Potential verfügt. So schützt die intravitreale Injektion von rhNorrin vor der NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen (RGC) und die ektopre Norrin-Überexpression in  $\beta$ B1-Norrin Mäusen fördert die Rekapillarisation vasoobliterierter Areale nach einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie (OIR). Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass für die neuroprotektive als auch für die angiogene Funktion die Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs essentiell ist. Der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg kann auch durch die gezielte Inhibition der GSK-3 $\beta$ , einem zentralen Element des Signalweges, mit Lithiumchlorid (LiCl) oder dem Indolylmaleimid-Derivat SB216763 aktiviert werden.

Das Ziel dieser Dissertation bestand zum einen darin, die chronische Wirkung von Norrin auf retinale Ganglienzellen zu untersuchen, wobei transgene Pax6-Norrin Mäuse, mit Expression von Norrin, unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Enhancerelements des murinen Pax6 Promotors, analysiert werden sollten.

Die Phänotypanalyse der transgenen Pax6-Norrin Mäuse zeigte eine Expression von transgenem Norrin in der Retina und eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der inneren Netzhaut. In diesen Tieren waren der *N. opticus*, die Netzhautschichten und der vordere Augenabschnitt normal ausgebildet. Bei NMDA-vermittelter RGC-Schädigung konnte keine protektive Wirkung der chronischen Norrin-Überexpression gefunden werden. Um den Einfluss des transgenen Norrins auf eine chronische RGC-Degeneration zu untersuchen, wurden die Pax6-Norrin Mäuse in den genetischen DBA/2J Hintergrund rückgekreuzt, indem sich mit zunehmendem Alter ein Sekundärglaukom entwickelt. Die Analyse ergab in den transgenen Mäusen eine Verminderung des DBA/2J-typischen intraokularen Druckanstiegs und einen Schutz vor starkem RGC-Verlust. Somit zeigen die erhobenen Daten, dass die intra-retinale Norrin-Überexpression eine chronische glaukomatöse Schädigung des *N. opticus* bzw. der RGC im genetischen DBA/2J Hintergrund vermindern kann.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit bestand darin, den Signalweg, welcher die angiogenen Eigenschaften von Norrin vermittelt, eingehender zu analysieren. Hierfür sollte in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten der klassische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

mit Inhibitoren der GSK-3 $\beta$  aktiviert werden, um festzustellen, ob eine generelle Stimulation des kanonischen Signalwegs ausreicht, um Norrin-ähnliche angiogene Wirkungen zu erzielen. Darüber hinaus war die Frage, ob eine Induktion der IGF-1-Expression mit der Vermittlung der angiogenen Eigenschaften von Norrin verknüpft ist, Gegenstand der vorliegenden Arbeit und sollte *in vitro* als auch *in vivo* überprüft werden.

Durch die Inkubation von humanen dermalen Endothelzellen (HDMEC) mit LiCl bzw. SB216763 konnte *in vitro* der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert werden. Auch konnte in diesen Zellen durch die GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren angiogene Eigenschaften wie die Zellproliferation, die Migration und das Überleben induziert werden. Der LiCl-vermittelte Effekt auf die Zellproliferation konnte mit Hilfe von Quercetin, einem Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs blockiert werden. *In vivo* konnte zwar durch LiCl-Injektion der kanonische Wnt-Signalweg nach Induktion einer OIR aktiviert werden, allerdings hatte dies keinen Einfluss auf die Rekapillarisation vasoobliterierter Areale. Die Ergebnisse zeigen, dass die unspezifische Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren *in vitro* Norrin-ähnliche angiogene Eigenschaften induziert. *In vivo* scheint jedoch eine spezifische, Norrin-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs entscheidend für eine verstärkte Rekapillarisation nach einer OIR zu sein.

Die *in vitro*-Analyse von HDMEC und Müllerzellen aus der Ratte zeigte in beiden Zelltypen eine Induktion der IGF-1-Expression durch Norrin, die durch Dickkopf-1, einen Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs, blockiert werden konnte. *In vivo* fand sich in Norrin-überexprimierenden  $\beta$ B1-Norrin Mäusen 24 h nach Hyperoxie-Exposition im OIR-Modell eine Induktion der IGF-1-Expression. Durch die Injektion inhibitorischer Antikörper gegen IGF-1 direkt im Anschluss an die Hyperoxie-Phase, konnte die Rekapillarisation der vasoobliterierten Areale signifikant unterdrückt werden. Somit scheint der Norrin-vermittelte Effekt der Rekapillarisation von avaskulären Netzhautarealen nach Induktion einer OIR zumindest partiell über eine gesteigerte IGF-1-Expression zu erfolgen.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Anderson, M.G., Libby, R.T., Gould, D.B., Smith, R.S. & John, S.W.M. 2005. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 4566–4571.
- Anderson, M.G., Smith, R.S., Hawes, N.L., Zabaleta, A., Chang, B., Wiggs, J.L. & John, S.W.M. 2002. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat. Genet.* **30**, 81–85.
- Battinelli, E.M., Boyd, Y., Craig, I.W., Breakefield, X.O. & Chen, Z.Y. 1996. Characterization and mapping of the mouse NDP (Norrie disease) locus (Ndp). *Mamm. Genome* **7**, 93–97.
- Beaulieu, J.-M., Marion, S., Rodriguiz, R.M., Medvedev, I.O., Sotnikova, T.D., Ghisi, V., Wetsel, W.C., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. 2008. A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* **132**, 125–136.
- Berger, W., van de Pol, D., Bächner, D., Oerlemans, F., Winkens, H., Hameister, H., Wieringa, B., Hendriks, W. & Ropers, H.H. 1996. An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 51–59.
- Berger, W., van de Pol, D., Warburg, M., Gal, A., Bleeker-Wagemakers, L., Silva, H. de, Meindl, A., Meitinger, T., Cremers, F. & Ropers, H.H. 1992. Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 461–465.
- Berg, J.M., Stryer, L. & Tymoczko, J.L. 2003. Biochemie. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg [etc.].
- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D. & Wang, R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **4**, 14–19.
- Braunger, B.M., Ohlmann, A., Koch, M., Tanimoto, N., Volz, C., Yang, Y., Bösl, M.R., Cvekl, A., Jägle, H., Seeliger, M.W. & Tamm, E.R. 2013. Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ $\beta$ -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol. Dis.* **50**, 1–12.
- Butler-Munro, C., Coddington, E.J., Shirley, C.H. & Heyward, P.M. 2010. Lithium modulates cortical excitability in vitro. *Brain Res.* **1352**, 50–60.
- Cade, J.F.J. 1949. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med. J. Aust.* **2**, 349–352.
- Campbell, N.A. 1997. Biologie. Spektrum, Akademie, Heidelberg, Berlin.

- Caprara, C. & Grimm, C. 2012. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease. *Prog Retin Eye Res* **31**, 89–119.
- Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S. & Heckenlively, J.R. 2002. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.* **42**, 517–525.
- Chang, B., Smith, R.S., Hawes, N.L., Anderson, M.G., Zabaleta, A., Savinova, O., Roderick, T.H., Heckenlively, J.R., Davisson, M.T. & John, S.W. 1999. Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat. Genet.* **21**, 405–409.
- Chan-Ling, T. 2010. Development of the Retinal Vasculature. In: Editor-in-Chief: Darlene A. Dartt (ed) *Encyclopedia of the Eye*, pp. 22–33. Academic Press, Oxford.
- Chen, J. & Smith, L.E.H. 2007. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* **10**, 133–140.
- Chen, J., Stahl, A., Krah, N.M., Seaward, M.R., Dennison, R.J., Sapieha, P., Hua, J., Hatton, C.J., Juan, A.M., Aderman, C.M., Willett, K.L., Guerin, K.I., Mammoto, A., Campbell, M. & Smith, L.E.H. 2011. Wnt signaling mediates pathological vascular growth in proliferative retinopathy. *Circulation* **124**, 1871–1881.
- Chen, Z.Y., Sims, K.B., Coleman, M., Donnai, D., Monaco, A., Breakefield, X.O., Davies, K.E. & Craig, I.W. 1992. Characterization of a YAC containing part or all of the Norrie disease locus. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 161–164.
- Choi, S.-E., Kang, Y., Jang, H.-J., Shin, H.-C., Kim, H.-E., Kim, H.-S., Kim, H.J., Kim, D.J. & Lee, K.-W. 2007. Involvement of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in palmitate-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *J. Vasc. Res.* **44**, 365–374.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**, 532-4, 536-7.
- Coghlan, M.P., Culbert, A.A., Cross, D.A., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch, O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith, D.G. & Murray, K.J. *et al.* 2000. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* **7**, 793–803.
- Cohen, P. & Goedert, M. 2004. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 479–487.
- Connor, K.M., Krah, N.M., Dennison, R.J., Aderman, C.M., Chen, J., Guerin, K.I., Sapieha, P., Stahl, A., Willett, K.L. & Smith, L.E.H. 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* **4**, 1565–1573.
- Coxon, K.M., Duggan, J., Guo, L. & Cordeiro, M.F. 2010. Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Neuroprotection. In: Editor-in-Chief: Darlene A. Dartt (ed) *Encyclopedia of the Eye*, pp. 62–72. Academic Press, Oxford.

- Cruciat, C.-M. & Niehrs, C. 2013. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.
- Cunha-Vaz, J. 2010. Blood–Retinal Barrier. In: Editor-in-Chief: Darlene A. Dartt (ed) *Encyclopedia of the Eye*, pp. 209–215. Academic Press, Oxford.
- Delafontaine, P. 1995. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* **30**, 825–834.
- Delafontaine, P., Bernstein, K.E. & Alexander, R.W. 1991. Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertension* **17**, 693–699.
- Delafontaine, P., Song, Y.-H. & Li, Y. 2004. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 435–444.
- Deng, C., Reddy, P., Cheng, Y., Luo, C.-W., Hsiao, C.-L. & Hsueh, A.J.W. 2013. Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J. Cell. Sci.*
- Doble, B.W. & Woodgett, J.R. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell. Sci.* **116**, 1175–1186.
- Donnai, D., Mountford, R.C. & Read, A.P. 1988. Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies. *J. Med. Genet.* **25**, 73–78.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E. & Friedlander, M. 2002. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3500–3510.
- Dorrell, M.I. & Friedlander, M. 2006. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res* **25**, 277–295.
- Duncan, M.K., Li, X., Ogino, H., Yasuda, K. & Piatigorsky, J. 1996. Developmental regulation of the chicken beta B1-crystallin promoter in transgenic mice. *Mech. Dev.* **57**, 79–89.
- Fields, R.D., Eshete, F., Stevens, B. & Itoh, K. 1997. Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in  $Ca^{2+}$ , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Neurosci.* **17**, 7252–7266.
- Gal, A., Wieringa, B., Smeets, D.F., Bleeker-Wagemakers, L. & Ropers, H.H. 1986. Submicroscopic interstitial deletion of the X chromosome explains a complex genetic syndrome dominated by Norrie disease. *Cytogenet. Cell Genet.* **42**, 219–224.
- Gariano, R.F. 2003. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res* **22**, 295–306.
- Gekle, M. 2010. Taschenlehrbuch Physiologie. Thieme, Stuttgart.

- Giménez, E. & Montoliu, L. 2001. A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Lab. Anim.* **35**, 153–156.
- Goka, A.K. & Farthing, M.J. 1987. The use of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* **8**, 29–41.
- Gray, H. & Lewis, W.H. 2000. Anatomy of the human body. Bartleby.com, New York.
- Grimes, C.A. & Jope, R.S. 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65**, 391–426.
- Grutzmacher, C., Park, S., Elmergreen, T.L., Tang, Y., Scheef, E.A., Sheibani, N. & Sorenson, C.M. 2010. Opposing effects of bim and bcl-2 on lung endothelial cell migration. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* **299**, L607.
- Harder, J.M., Fernandes, K.A. & Libby, R.T. 2012. The Bcl-2 family member BIM has multiple glaucoma-relevant functions in DBA/2J mice. *Sci. Rep.* **2**.
- Hartzer, M.K., Cheng, M., Liu, X. & Shastry, B.S. 1999. Localization of the Norrie disease gene mRNA by in situ hybridization. *Brain Res. Bull.* **49**, 355–358.
- Heckmann, M. 2008. Pathogenese der Retinopathia praematurorum. *Ophthalmologe* **105**, 1101–1107.
- Hellstrom, A., Perruzzi, C., Ju, M., Engstrom, E., Hard, A.L., Liu, J.L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Sjobell, L., LeRoith, D., Senger, D.R. & Smith, L.E. 2001. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 5804–5808.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28–32.
- Hicks, D. & Courtois, Y. 1990. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* **51**, 119–129.
- Holmes, L.B. 1971. Norrie's disease: an X-linked syndrome of retinal malformation, mental retardation, and deafness. *J. Pediatr.* **79**, 89–92.
- Howell, G.R., Libby, R.T., Jakobs, T.C., Smith, R.S., Phalan, F.C., Barter, J.W., Barbay, J.M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Porciatti, V., Whitmore, A.V., Masland, R.H. & John, S.W.M. 2007a. Axons of retinal ganglion cells are insulated in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell Biol.* **179**, 1523–1537.
- Howell, G.R., Libby, R.T., Marchant, J.K., Wilson, L.A., Cosma, I.M., Smith, R.S., Anderson, M.G. & John, S.W.M. 2007b. Absence of glaucoma in DBA/2J mice homozygous for wild-type versions of Gpnmb and Tyrp1. *BMC Genet.* **8**, 45.

- Howell, G.R., Macalinao, D.G., Sousa, G.L., Walden, M., Soto, I., Kneeland, S.C., Barbay, J.M., King, B.L., Marchant, J.K., Hibbs, M., Stevens, B., Barres, B.A., Clark, A.F., Libby, R.T. & John, S.W.M. 2011. Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J. Clin. Invest.* **121**, 1429–1444.
- Hsieh, M., Boerboom, D., Shimada, M., Lo, Y., Parlow, A.F., Luhmann, U.F.O., Berger, W. & Richards, J.S. 2005. Mice null for Frizzled4 (*Fzd4*<sup>-/-</sup>) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biol. Reprod.* **73**, 1135–1146.
- Hughes, S., Yang, H. & Chan-Ling, T. 2000. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 1217–1228.
- Jakobs, T.C., Libby, R.T., Ben, Y., John, S.W.M. & Masland, R.H. 2005. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J. Cell Biol.* **171**, 313–325.
- John, S.W., Smith, R.S., Savinova, O.V., Hawes, N.L., Chang, B., Turnbull, D., Davisson, M., Roderick, T.H. & Heckenlively, J.R. 1998. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 951–962.
- Joly, S., Lange, C., Thiersch, M., Samardzija, M. & Grimm, C. 2008. Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J. Neurosci.* **28**, 13765–13774.
- Junge, H.J., Yang, S., Burton, J.B., Paes, K., Shu, X., French, D.M., Costa, M., Rice, D.S. & Ye, W. 2009. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell* **139**, 299–311.
- Kaga, S., Zhan, L., Altaf, E. & Maulik, N. 2006. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40**, 138–147.
- Kim, Y.R., van Meer, M.P.A., Tejima, E., Murata, Y., Mandeville, J.B., Dai, G., Chuang, D.-M., Rosen, B.R. & Lo, E.H. 2008. Functional MRI of delayed chronic lithium treatment in rat focal cerebral ischemia. *Stroke* **39**, 439–447.
- Klein, P.S. & Melton, D.A. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8455–8459.
- Komiya, Y. & Habas, R. 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75.
- Kubota, Y. & Suda, T. 2009. Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 38–43.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lang, G.K. 2008. Augenheilkunde. Verstehen - lernen - anwenden. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Lee, H., Jo, D.H., Kim, J.H. & Kim, J.H. 2012. Norrin expression in endothelial cells in the developing mouse retina. *Acta Histochem.*
- Lenzner, S., Prietz, S., Feil, S., Nuber, U.A., Ropers, H.-H. & Berger, W. 2002. Global gene expression analysis in a mouse model for Norrie disease: late involvement of photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2825–2833.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. & Roberts, C.T. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* **16**, 143–163.
- Libby, R.T., Anderson, M.G., Pang, I.-H., Robinson, Z.H., Savinova, O.V., Cosma, I.M., Snow, A., Wilson, L.A., Smith, R.S., Clark, A.F. & John, S.W.M. 2005a. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* **22**, 637–648.
- Libby, R.T., Li, Y., Savinova, O.V., Barter, J., Smith, R.S., Nickells, R.W. & JOHN, S.W. 2005b. Susceptibility to Neurodegeneration in a Glaucoma Is Modified by Bax Gene Dosage. *PLoS Genet* **1**, e4.
- Libby, R.T., Li, Y., Savinova, O.V., Barter, J., Smith, R.S., Nickells, R.W. & John, S.W.M. 2005c. Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS Genet.* **1**, 17–26.
- Lin, S., Cheng, M., Dailey, W., Drenser, K. & Chintala, S. 2009. Norrin attenuates protease-mediated death of transformed retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* **15**, 26–37.
- Linseman, D.A., Phelps, R.A., Bouchard, R.J., Le, S.S., Laessig, T.A., McClure, M.L. & Heidenreich, K.A. 2002. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **22**, 9287–9297.
- Lipton, S.A. 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 160–170.
- Li, Q., Michaud, M., Canosa, S., Kuo, A. & Madri, J.A. 2011. GSK-3 $\beta$ : a signaling pathway node modulating neural stem cell and endothelial cell interactions. *Angiogenesis* **14**, 173–185.
- Li, Y., Schlamp, C.L. & Nickells, R.W. 1999. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1004–1008.



- Lofqvist, C., Willett, K.L., Aspegren, O., Smith, A.C.H., Aderman, C.M., Connor, K.M., Chen, J., Hellstrom, A. & Smith, L.E.H. 2009. Quantification and localization of the IGF/insulin system expression in retinal blood vessels and neurons during oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 1831–1837.
- Logan, C.Y. & Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781–810.
- Luhmann, U.F.O., Lin, J., Acar, N., Lammel, S., Feil, S., Grimm, C., Seeliger, M.W., Hammes, H.-P. & Berger, W. 2005a. Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 3372–3382.
- Luhmann, U.F.O., Meunier, D., Shi, W., Lüttges, A., Pfarrer, C., Fundele, R. & Berger, W. 2005b. Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: a new role of Norrin in reproduction. *Genesis* **42**, 253–262.
- Lüllmann-Rauch, R. 2012. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart, New York, NY.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26.
- Mao, W., Millar, J.C., Wang, W.-H., Silverman, S.M., Liu, Y., Wordinger, R.J., Rubin, J.S., Pang, I.-H. & Clark, A.F. 2012. Existence of the canonical Wnt signaling pathway in the human trabecular meshwork. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 7043–7051.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. & Gruss, P. 2001. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43–55.
- McLeod, D.S., Hasegawa, T., Prow, T., Merges, C. & Luttly, G. 2006. The initial fetal human retinal vasculature develops by vasculogenesis. *Dev. Dyn.* **235**, 3336–3347.
- McNeill, B., Mazerolle, C., Bassett, E.A., Mears, A.J., Ringuette, R., Lagali, P., Picketts, D.J., Paes, K., Rice, D. & Wallace, V.A. 2013. Hedgehog regulates Norrie disease protein to drive neural progenitor self-renewal. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1005–1016.
- Meindl, A., Berger, W., Meitinger, T., van de Pol, D., Achatz, H., Dörner, C., Haasemann, M., Hellebrand, H., Gal, A. & Cremers, F. 1992. Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat. Genet.* **2**, 139–143.
- Moses, R.A. 1958. The Goldman applanation tonometer. *Am. J. Ophthalmol.* **46**, 865–869.

- Nikopoulos, K., Venselaar, H., Collin, R.W.J., Riveiro-Alvarez, R., Boonstra, F.N., Hooymans, J.M.M., Mukhopadhyay, A., Shears, D., van Bers, M., Wijs, I.J. de, van Essen, A.J., Sijmons, R.H., Tilanus, M.A.D., van Nouhuys, C.E., Ayuso, C. & Hoefsloot, L.H. *et al.* 2010. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum. Mutat.* **31**, 656–666.
- Norrie, G. 1927. Causes of blindness in children. *Acta Ophthalmologica* **5**, 357–386.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. & Huang, D.C. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* **17**, 384–395.
- Ohlmann, A., Scholz, M., Goldwich, A., Chauhan, B.K., Hudl, K., Ohlmann, A.V., Zrenner, E., Berger, W., Cvekl, A., Seeliger, M.W. & Tamm, E.R. 2005. Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J. Neurosci.* **25**, 1701–1710.
- Ohlmann, A., Seitz, R., Braunger, B., Seitz, D., Bösl, M.R. & Tamm, E.R. 2010. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J. Neurosci.* **30**, 183–193.
- Ohlmann, A. & Tamm, E.R. 2012. Norrin: molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. *Prog Retin Eye Res* **31**, 243–257.
- Ohlmann, A.V., Adamek, E., Ohlmann, A. & Lütjen-Drecoll, E. 2004. Norrie gene product is necessary for regression of hyaloid vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2384–2390.
- Paes, K.T., Wang, E., Henze, K., Vogel, P., Read, R., Suwanichkul, A., Kirkpatrick, L.L., Potter, D., Newhouse, M.M. & Rice, D.S. 2011. Frizzled 4 is required for retinal angiogenesis and maintenance of the blood-retina barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 6452–6461.
- Park, C.H., Chang, J.Y., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.-K. & Yang, C.H. 2005. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 227–234.
- Park, H.-J., Kim, H.-J., Bae, G.-S., Seo, S.-W., Kim, D.-Y., Jung, W.-S., Kim, M.-S., Song, M.-Y., Kim, E.-K., Kwon, K.-B., Hwang, S.-Y., Song, H.-J., Park, C.-S., Park, R.-K., Chong, M.-S. & Park, S.-J. 2009. Selective GSK-3beta inhibitors attenuate the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells. *Hear. Res.* **257**, 53–62.
- Perez-Vilar, J. & Hill, R.L. 1997. Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **272**, 33410–33415.
- Phiel, C.J. & Klein, P.S. 2001. Molecular targets of lithium action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 789–813.

- Pierce, E.A., Avery, R.L., Foley, E.D., Aiello, L.P. & Smith, L.E. 1995. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 905–909.
- Rattner, A. & Nathans, J. 2005. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J. Neurosci.* **25**, 4540–4549.
- Rehm, H.L., Zhang, D.-S., Brown, M.C., Burgess, B., Halpin, C., Berger, W., Morton, C.C., Corey, D.P. & Chen, Z.-Y. 2002. Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J. Neurosci.* **22**, 4286–4292.
- Reis, M. & Liebner, S. 2013. Wnt signaling in the vasculature. *Exp. Cell Res.* **319**, 1317–1323.
- Richardson, K.C., Jarett, L. & Finke, E.H. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* **35**, 313–323.
- Richter, M., Gottanka, J., May, C.A., Welge-Lüssen, U., Berger, W. & Lütjen-Drecoll, E. 1998. Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2450–2457.
- Rohen, J.W. & Lütjen-Drecoll, E. 2000. Funktionelle Histologie. Kurzgefasstes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten ; mit 24 Tabellen. Schattauer, Stuttgart, New York.
- Ruether, K., van de Pol, D., Jaissle, G., Berger, W., Tornow, R.P. & Zrenner, E. 1997. Retinoschisislike alterations in the mouse eye caused by gene targeting of the Norrie disease gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 710–718.
- Russell, A.J., Fincher, E.F., Millman, L., Smith, R., Vela, V., Waterman, E.A., Dey, C.N., Guide, S., Weaver, V.M. & Marinkovich, M.P. 2003. Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin. *J. Cell. Sci.* **116**, 3543–3556.
- Ryves, W.J. & Harwood, A.J. 2001. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 720–725.
- Sall, J.W., Klisovic, D.D., O'Dorisio, M.S. & Katz, S.E. 2004. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **79**, 465–476.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A.H. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **10**, 55–63.
- Sato, T., Fujikado, T., Morimoto, T., Matsushita, K., Harada, T. & Tano, Y. 2008. Effect of electrical stimulation on IGF-1 transcription by L-type calcium channels in cultured retinal Müller cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* **52**, 217–223.

- Schäfer, N.F., Luhmann, U.F.O., Feil, S. & Berger, W. 2009. Differential gene expression in Ndph-knockout mice in retinal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 906–916.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108.
- Schuettauf, F., Rejdak, R., Walski, M., Frontczak-Baniewicz, M., Voelker, M., Blatsios, G., Shinoda, K., Zagorski, Z., Zrenner, E. & Grieb, P. 2004. Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse-a model for ocular hypertension. *Acta Neuropathol.* **107**, 352–358.
- Schultze, W.H. 1972. Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnelfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt. *Zentralbl Pathol* **36**, 639–640.
- Seitz, R., Hackl, S., Seibuchner, T., Tamm, E.R. & Ohlmann, A. 2010. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J. Neurosci.* **30**, 5998–6010.
- Shen, Y., Liu, X.-L. & Yang, X.-L. 2006. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol. Neurobiol.* **34**, 163–179.
- Siliprandi, R., Canella, R., Carmignoto, G., Schiavo, N., Zanellato, A., Zanoni, R. & Vantini, G. 1992. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis. Neurosci.* **8**, 567–573.
- Slaughter, M.M. 2010. Glutamate Receptors in Retina. In: Editor-in-Chief: Darlene A. Dartt (ed) *Encyclopedia of the Eye*, pp. 222–226. Academic Press, Oxford.
- Smallwood, P.M., Williams, J., Xu, Q., Leahy, D.J. & Nathans, J. 2007. Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. *J. Biol. Chem.* **282**, 4057–4068.
- Smith, L.E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinose, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J.M. & Senger, D.R. 1999. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat. Med.* **5**, 1390–1395.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B.P., Son, J.L., Roberson, E.D.O., Steele, M.R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Horner, P.J. & Marsh-Armstrong, N. 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci.* **28**, 548–561.
- Spencer, W.H. 1996. Ophthalmic pathology. An atlas and textbook. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., Hua, J., Löfqvist, C., Hellström, A. & Smith, L.E.H. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2813–2826.
- Stan, R.V., Kubitz, M. & Palade, G.E. 1999. PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13203–13207.
- Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N.J. & Lewis, C.E. 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* **85**, 233–248.
- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T. & Keshet, E. 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.* **15**, 4738–4747.
- Sugimoto, E.-i., Aihara, M., Ota, T. & Araie, M. 2006. Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure. *J. Glaucoma* **15**, 505–511.
- Tamm, E.R. & Fuchshofer, R. 2007. What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol* **52 Suppl 2**, S101-4.
- Taylor, B.A. & Grieco, D. 1991. Localization of the gene encoding insulin-like growth factor I on mouse chromosome 10. *Cytogenet. Cell Genet.* **56**, 57–58.
- Tektas, O.-Y. & Lütjen-Drecoll, E. 2009. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp. Eye Res.* **88**, 769–775.
- Tokunaga, C.C., Chen, Y.-H., Dailey, W., Cheng, M. & Drenser, K.A. 2013. Retinal vascular rescue of oxygen-induced retinopathy in mice by norrin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 222–229.
- Tricoli, J.V., Rall, L.B., Scott, J., Bell, G.I. & Shows, T.B. 1984. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* **310**, 784–786.
- Wada, A. 2009. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. *J. Pharmacol. Sci.* **110**, 14–28.
- Wang, S., Park, S., Fei, P. & Sorenson, C.M. 2011. Bim is responsible for the inherent sensitivity of the developing retinal vasculature to hyperoxia. *Developmental Biology* **349**, 296–309.
- Wang, Y., Rattner, A., Zhou, Y., Williams, J., Smallwood, P.M. & Nathans, J. 2012. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* **151**, 1332–1344.
- Warburg, M. 1961. Norrie's disease. *Acta Ophthalmologica* **39**, 757–772.

- Warburg, M. 1966. Norrie's disease. A congenital progressive oculo-acoustico-cerebral degeneration. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, Suppl 89:1-47.
- Warburg, M. 1971. Norrie's disease. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **7**, 117–124.
- Watanabe, T. & Raff, M.C. 1988. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**, 834–837.
- Wehner, R., Gehring, W.J. & Kühn, A. 1995. Zoologie. 29 Tab. Thieme, Stuttgart, New York.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* **22**, 130-1, 134-8.
- Wong, M.L. & Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75–85.
- Xia, C.-H., Liu, H., Cheung, D., Wang, M., Cheng, C., Du, X., Chang, B., Beutler, B. & Gong, X. 2008. A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1605–1612.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K. & Nathans, J. 2004. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **116**, 883–895.
- Xu, S., Cheng, F., Liang, J., Wu, W., Zhang, J. & Stemple, D.L. 2012. Maternal xNorrin, a Canonical Wnt Signaling Agonist and TGF- $\beta$  Antagonist, Controls Early Neuroectoderm Specification in *Xenopus*. *PLoS Biol* **10**, e1001286.
- Yap, A.S., Briehner, W.M. & Gumbiner, B.M. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 119–146.
- Ye, X., Smallwood, P. & Nathans, J. 2011. Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expr. Patterns* **11**, 151–155.
- Ye, X., Wang, Y., Cahill, H., Yu, M., Badea, T.C., Smallwood, P.M., Peachey, N.S. & Nathans, J. 2009. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell* **139**, 285–298.
- Ye, X., Wang, Y. & Nathans, J. 2010. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* **16**, 417–425.
- Zuercher, J., Fritzsche, M., Feil, S., Mohn, L. & Berger, W. 2012. Norrin stimulates cell proliferation in the superficial retinal vascular plexus and is pivotal for the recruitment of mural cells. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2619–2630.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
a	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ad	zu
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
Akt	Proteinkinase B
AP	alkalische Phosphatase
APC	„Adenomatous polyposis coli“
APS	Ammoniumpersulfat
AUT	Österreich
Bax	„BCL2-associated X protein“
BCA	„Bicinchoninic acid“
Bcl2	„B-cell CLL/lymphoma 2“
Bdnf	„Brain-derived neurotrophic factor“
BEL	Belgien
Bim	„Bcl2-interacting mediator of cell death“
BMP	„Bone morphogenetic protein“
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin, Zenti-
C57BL/6	Maus-Inzuchtstamm
CAN	Kanada
CD-1	Maus-Auszuchtstamm
cDNA	komplementäre DNA
Ch	Choroidea
CK1	„Casein kinase 1, alpha 1“
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>t</sub>	„Cycle threshold“
Cu	Kupfer
d. h.	das heißt
D2	DBA/2J
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBA/2J	Maus-Inzuchtstamm
DDSA	2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride
DEN	Dänemark
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Dioxygenin

DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMP-30	2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dvl2	„Dishevelled2“
E	Extinktion
EBNA1	„Epstein-Barr nuclear antigen 1“
Edn2	„Endothelin 2“
EDTA	Ethylendiamintereessigsäure
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
ERG	Elektroretinogramm
<i>et al.</i>	und andere
FBS	fetales Rinderserum
Fgf2	„Fibroblast growth factor 2“
FIN	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FVB/N	Maus-Inzuchtstamm
Fzd4/Fzl4	Frizzled-4-Rezeptor
g	Erdbeschleunigung, Gramm, Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht
Glast	„Glutamate aspartate transporter“
GNB2L1	„Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1“
Gpnmb	„Glycoprotein (transmembrane) nmb“
GSK3-β	„Glycogen synthase kinase-3β“
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HEK	„Human Embryonic Kidney“
HIF-1α	„Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit“
HindIII	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i>
His	Histidin
HRMEC	humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IGF-1	„Insulin-like growth factor 1“
IGF-1R	IGF-1-Rezeptor
IGFBP	IGF-Bindeproteine
<i>in situ</i>	an Ort und Stelle
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	am lebenden Objekt
INL	innere Körnerschicht



IOD	intraokularer Druck
IPL	innere plexiforme Schicht
IS	Innensegmente
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LEF	„Lymphoid enhancer-binding factor“
LGR4	„Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4“
LiCl	Lithiumchlorid
Lif	„Leukemia inhibitory factor“
Lrp	„Low density lipoprotein receptor-related protein“
m	Meter
m	Milli-
M	molar
MAPK	„Mitogen-activated protein kinase“
min	Minute
MM	Magermilchpulver
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MNA	Methylnadicanhydrid
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MWCO	„Molecular weight cut off “
n	Nano-
<i>N.</i>	<i>Nervus</i>
NaOH	Natriumhydroxid
Ndp	„Norrie disease (pseudoglioma)“
NED	Niederlande
NFL	Nervenfaserschicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>Nn.</i>	<i>Nervi</i>
NV	Neovaskularisierung
OIR	Sauerstoff-induzierte Retinopathie
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegmente
P	postnataler Tag
p	„Probability“
Pax6	„Paired box 6“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFB	„Platelet-derived growth factor $\beta$ “
PFA	Paraformaldehyd
PhP	0,1 M Phosphatpuffer
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

Plvap	„Plasmalemma vesicle associated protein“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rd4	„Retinal degeneration 4“
RGC	retinale Ganglienzellen
rhNorrin	rekombinantes humanes Norrin
RIPA	„Radio immuno precipitation assay“
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	<i>Retinopathia praematurorum</i>
RPE	retinales Pigmentepithel
Rpe65	„Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa“
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg
SB216763	„3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SMAD	„SMAD family member“
t	Thymin
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TCF	„T-cell factor“
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	„Transforming growth factor beta“
Tie2	„Endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2“
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Tyrp1	„Tyrosinase-related protein 1“
U	Enzymeinheit
UK	Vereinigtes Königreich
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“
VEGFR2	„Vascular endothelial growth factor receptor 2“
vs.	versus
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
Wnt	„Wingless/integrated“
WST-1	„Water soluble tetrazolium 1“
x	mal, -fach
z . B.	zum Beispiel

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\beta$ B1-Norrin	$\beta$ B1-Crystallin-Norrin
$\beta$ -Trcp	„Beta-transducin repeat containing“
$\Delta$	Delta
$\kappa$	Kappa

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Norrin als multifunktionaler Ligand. ....	3
Abb. 2: Der Frizzeld-4-Norrin-Signalweg. ....	6
Abb. 3: Schichten und Zelltypen der Netzhaut des Menschen. ....	10
Abb. 4: Gefäßentwicklung in der Netzhaut der Maus. ....	13
Abb. 5: Die Rolle von VEGF und IGF-1 bei der Pathogenese der <i>Retinopathia praematurorum</i> . ....	14
Abb. 6: Das Hyperoxie-induzierte ROP-Mausmodell. ....	15
Abb. 7: Schematische Darstellung des transgenen Konstrukts der Pax6-Norrin Mäuse. ....	40
Abb. 8: Raster für die Bestimmung der Axonzahl des <i>Nervus opticus</i> . ....	49
Abb. 9: Aufreinigung von rhNorrin. ....	67
Abb. 10: Expression transgener Norrin-mRNA in der Netzhaut von Pax6-Norrin 04 Mäusen. ....	74
Abb. 11: Akkumulation von $\beta$ -Catenin in der inneren Netzhaut von Pax6-Norrin Mäusen. ....	76
Abb. 12: Lichtmikroskopie von Pax6-Norrin Mäusen ....	77
Abb. 13: Pax6-Norrin Mäuse zeigen keine Veränderung der retinalen Gesamtdicke, der INL und ONL. ....	79
Abb. 14: Pax6-Norrin Mäuse unterscheiden sich nicht in der Axonzahl im <i>Nervus opticus</i> von genetisch identischen Wildtyptieren. ....	81
Abb. 15: Der vordere Augenabschnitt in Pax6-Norrin Mäusen ist normal ausgebildet. ....	81
Abb. 16: Pax6-Norrin Mäuse sind nicht vor NMDA-induziertem RGC-Axonverlust geschützt. ....	83
Abb. 17: Die Axonzahl im <i>N. opticus</i> von Pax6-Norrin/DBA/2J Mäusen ist im Alter von 8 Wochen identisch mit der von Wildtypen. ....	85
Abb. 18: Pax6-Norrin/D2 Mäuse zeigen einen geringeren IOD als wildtypische Kontrolltiere. ....	86
Abb. 19: In Pax6-Norrin/D2 Mäusen und D2 Geschwistern bilden sich vordere Synechien aus. ....	88
Abb. 20: Pigmentepithelatrophy der Iris in Pax6-Norrin/D2 Mäusen und D2 Wurfgeschwistern. ....	90

Abb. 21: Atrophie des Ziliarkörpers in Pax6-Norrin/D2 Mäusen und DBA/2J Geschwistern.....	91
Abb. 22: Pax6-Norrin/D2-Mäuse und D2 wildtypische Kontrolltiere zeigen teilweise eine Invasion von Zellen aus der äußeren Körnerschicht in den subretinalen Spalt.	92
Abb. 23: Pax6-Norrin/D2 Mäuse zeigen einen deutlich geringeren Axonverlust im <i>N. opticus</i> als D2 Kontrolltiere.....	94
Abb. 24: LiCl aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in HDMEC. ....	96
Abb. 25: SB216763 aktiviert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in HDMEC.....	97
Abb. 26: LiCl induziert die Proliferation von HDMEC über die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.....	98
Abb. 27: SB216763 induziert die Proliferation von HDMEC. ....	99
Abb. 28: LiCl und SB216763 steigern die Viabilität von HDMEC.....	100
Abb. 29: LiCl induziert die Migration von HDMEC. ....	101
Abb. 30: Intraperitoneal injiziertes LiCl hat keinen Einfluss auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Induktion einer OIR. ....	103
Abb. 31: Intraperitoneale LiCl-Injektion induziert $\beta$ -Catenin-Akkumulation in der INL. ....	104
Abb. 32: Intravitreale LiCl-Injektion hat keinen Einfluss auf die Rekapillarisation von ischämischen Netzhautarealen nach Induktion einer OIR. ....	106
Abb. 33: Norrin induziert die Expression von IGF-1 in HDMEC.....	108
Abb. 34: Norrin induziert die Expression von IGF-1 in Müllerzellen.....	109
Abb. 35: Norrin erhöht die IGF-1-Expression nach einer Sauerstoff-induzierten Retinopathie. ....	111
Abb. 36: Norrin vermittelt die Rekapillarisation nach OIR teilweise über eine erhöhte IGF-1-Expression. ....	114

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der eingesetzten Reagenzien .....	20
Tabelle 2: Auflistung der Enzyme und Reagenzien-Kits.....	23
Tabelle 3: Primer für Northern Blot Sonden.....	23
Tabelle 4: Genotypisierungsprimer.....	23
Tabelle 5: Übersicht der für quantitative real-time RT-PCR Analysen verwendeten Primer.....	24
Tabelle 6: Liste der eingesetzten Antikörper für Western Blot Analysen, Dot Blot Analysen, Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	24
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Gele .....	25
Tabelle 8: Rezepte der eingesetzten Lösungen und Puffer.....	25
Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und Materialien .....	29
Tabelle 10: Auflistung der Verbrauchsmaterialien .....	30
Tabelle 11: Auflistung von Herkunft und Kultivierbedingungen der Müllerzellen .....	33
Tabelle 12: Auflistung von Herkunft und Kultivierbedingungen der HDMEC .....	34
Tabelle 13: Auflistung von Herkunft und Kultivierbedingungen der EBNA-pSNOS ..	35
Tabelle 14: Übersicht über die Zellbehandlungen für RNA- und Proteinanalysen....	35
Tabelle 15: Übersicht der mittels BrdU-ELISA untersuchten Behandlungen .....	37
Tabelle 16: Übersicht der mit Hilfe des WST-1 Assays analysierten Behandlungen	38
Tabelle 17: Protokoll für die Fixierung, Blockierung und Antikörperinkubation .....	39
Tabelle 18: Liste der durchgeführten Perfusionen.....	42
Tabelle 19: Übersicht der Entnahme von Augen und Sehnerven .....	43
Tabelle 20: Liste der intravitrealen Injektionen .....	45
Tabelle 21: Bewertungskriterien für Veränderungen der Augenvorderkammer.....	47
Tabelle 22: Kriterien zur Bewertung der Sehnervenschädigung.....	48
Tabelle 23: 25 µl Reaktionsansatz (1x) für SV40-PCR.....	52
Tabelle 24: Thermocyclerprogramm für SV40-PCR .....	53
Tabelle 25: 10 µl Reaktionsansätze (1x) für cDNA-Synthese.....	57
Tabelle 26: Thermocyclerprogramm für cDNA-Synthese .....	57
Tabelle 27: 15 µl Reaktionsansatz (1x) für die quantitative real-time PCR.....	59
Tabelle 28: Cyclerprogramm für die quantitative real-time PCR.....	59
Tabelle 29: Liste der nachgewiesenen Proteine und der dazu analysierten Proben	66

Tabelle 30: Protokolle für die Blockierung und Antikörperinkubation zum Nachweis spezifische Proteine .....	66
Tabelle 31: Protokoll für die Blockierung und Antikörperinkubation.....	72

## 7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Ohlmann für die interessante und vielschichtige Fragestellung sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Insbesondere möchte ich Ihm für die umfassende Betreuung und die stets hilfreichen Ratschläge zu meinem Thema danken.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm bedanken, mich sowohl für meine Diplomarbeit als auch für meine Dissertation an seinem Lehrstuhl aufgenommen und unterstützt zu haben.

Darüber hinaus danke ich der PRO RETINA-Stiftung, die mich und meine Arbeit durch ein Promotionsstipendium zwei Jahre lang finanziell gefördert hat.

Dr. Roswitha Seitz, Berna Sentürk, Stephanie Leopold, Birgit Müller, Daniel Wöhl, Christian Eimer, David Seitz, Sebastian Albrecht sowie allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Ohlmann möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit am Norrin-Themenkomplex danken.

Bei Margit Schimmel, Elke Stauber, Angelika Pach, Silvia Babl, Eva Zitzelsperger und Corinna Unger möchte ich mich für die hilfsbereite Unterstützung bei histologischen, immunhistologischen, molekularbiologischen und bei *in vitro* Versuchen bedanken.

Vor allem möchte ich Patrick Zadavec und Martin Gallenberger für den hervorragenden fachlichen Austausch während der gemeinsamen Arbeitspausen danken. Weiterhin danke ich auch allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.



Der meiste Dank gebührt meinen Eltern und meiner Ehefrau Sandra, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, motiviert und mir neue Kraft für meine Arbeit gegeben haben.

## **7.6 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 13.06.2013

Ludwig Franz Zeilbeck